



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/30, C07K 14/445, 16/20, A61K 39/015, 39/395, A01K 39/385, G01N 33/68, C12N 15/70, C07K 17/08</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 96/41877 (43) Date de publication internationale: 27 décembre 1996 (27.12.96)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00894 (22) Date de dépôt international: 12 juin 1996 (12.06.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/07007 13 juin 1995 (13.06.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DRUILHE, Pierre [FR/FR]; 6 bis, rue d'Auteuil, F-75016 Paris (FR). DAUBERSIES, Pierre [FR/FR]; 43, rue Gutenberg, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>
<p>(54) Title: MALARIAL PRE-ERYTHROCYTIC STAGE POLYPEPTIDE MOLECULES (54) Titre: MOLECULES POLYPEPTIDIQUES DE STADE PRE-ERYTHROCYTAIRE DU PALUDISME</p> <p>-RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQEQQHNV -VEESVEENDEESVEENVEENVENNDDGSSVASSVEESIASSVDESIDSSIE - ENVAPTVEEINAPTVEEINAPSWVEKCAPSVEESVAPSVEESVAEMLKER (729S) (I)</p> <p>- RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQEQQHNV - DELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQ (NR I), - LEESQVNDDIFNSLVKSVQEQQHNV (NR II), - VESVAPSVEESVAPSVEESVAENVEESV. (729 RE)</p> <p>(57) Abstract Polypeptide molecules containing at least 10 consecutive amino acids of the amino acid sequence representing antigen LSA-3 and shown in figure 2, with the exception of the polypeptides (I).</p> <p>(57) Abrégé Molécules polypeptidiques contenant au moins 10 amino acides consécutifs de la séquence d'acides aminés représentant l'antigène LSA-3 montrée dans la figure 2, les polypeptides (I) étant exclus.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

MOLECULES POLYPEPTIDIQUES DE STADE PRE-ERYTHROCYTAIRE DU PALUDISME.

Les parasites responsables du paludisme chez l'homme présentent
5 chez l'hôte humain des morphologies différentes et expriment des
antigènes différents en fonction de leur localisation dans l'organisme. Les
différences morphologiques et antigéniques de ces parasites au cours de
leurs cycles de vie chez l'homme, permettent de définir différents stades
de développement dans le foie et dans le sang : le sporozoïte, forme
10 infectieuse injectée par le moustique vecteur, se transforme rapidement en
schizonte dans les hépatocytes de l'hôte pour infecter ensuite les
erythrocytes. La localisation intra-hépatique de P.falciparum se traduit par
l'expression d'un groupe d'antigènes spécifiques de ce stade de
développement et très immunogènes dans les condition naturelles
15 d'exposition à la maladie. Cette phase, cliniquement silencieuse, est
actuellement la seule contre laquelle on peut induire expérimentalement
chez l'homme une immunité très forte, stérilisante, par injection de
sporozoïtes irradiés, capables de pénétrer dans l'hépatocyte et de s'y
développer, mais sans pouvoir aboutir au stade sanguin de la maladie.
20 C'est pourquoi les inventeurs ont focalisé l'essentiel de leurs efforts sur
ces deux stades pré-érythrocytaires. Mais ces stades sont également les
plus délicats à étudier, et donc les moins connus, puisque l'obtention de
matériel biologique est difficile, voire impossible, que le seul modèle
d'étude in vitro possède un rendement très faible et que le meilleur modèle
25 animal reste le chimpanzé, d'utilisation limitée et onéreuse.

Afin d'accéder aux antigènes des stades pré-érythrocytaires, les
inventeurs ont utilisé des sérums d'individus résidant en zone d'endémie
depuis 25 ans mais sous prophylaxie permanente à la chloroquine. Ces
individus étaient régulièrement soumis aux piqûres de moustiques infectés
30 mais ne développaient aucune infection sanguine complète. Leur sérum
contenait donc des anticorps essentiellement dirigés contre les stades pré-

érythrocytaires, ce qui fut vérifié par Immuno-Fluorescence (IF) et Western Blot sur les 3 stades du parasite.

L'utilisation de ces sérums pour le criblage d'une banque d'ADN génomique du clone parasite de P.falciparum, construite en vecteurs d'expression dans un phage lambda gt11 (V. Rosario, Science 212, 1981, p.1037-1038 ; et Thaithong et al, Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1984, 78 : 242-245) a conduit à la mise en évidence de polypeptides du stade pré-érythrocytaire, notamment les polypeptides SALSA (pour Sporozoite Liver Stage Antigen) décrits dans EP A-0407230 et le LSA 1 (pour Liver Stage Antigen) décrit dans WO 92/13884. La présente invention est relative à de nouvelles molécules polypeptidiques spécifiques du stade pré-érythrocytaire et à leur utilisation à titre de principe actif de vaccin anti-palustre ou dans des méthodes de diagnostics de la maladie.

L'invention résulte de la mise en évidence par les inventeurs des propriétés particulières d'un antigène particulier appelé LSA-3 et de ses fragments, qui apparaissent comme des candidats à fort potentiel pour réaliser un vaccin anti-palustre et ceci pour les raisons suivantes :

- a) lorsque une fraction de LSA-3 était utilisée en combinaison avec un autre antigène du même stade de développement du parasite, comme le LSA-1, pour immuniser des chimpanzés, l'animal répondant aux deux molécules ou uniquement à LSA-3 présente la caractéristique de ne pas avoir de parasites dans le sang, d'avoir une diminution importante des parasites dans le foie, et de manifester un recrutement de cellules mononucléées important indiquant une réponse en immunité cellulaire ;
- b) en zone d'endémie, on observe une très nette corrélation entre la protection des individus contre les infections naturelles par sporozoïtes et leurs réponses en anticorps contre LSA-3 ;
- c) chez huit volontaires humains immunisés par injection de sporozoïtes irradiés, des anticorps dirigés contre LSA-3 sont trouvés chez chacun des

quatre individus résistant à une infection par sporozoïtes et chez aucun des quatre autres volontaires ayant développé une infection sanguine ;

d) des anticorps obtenus contre le peptide DG729 dans WO 92/13884 déjà décrit donnent une réaction croisée avec les stades sporozoïtes et
5 hépatiques du parasite murin P. yoelii ce qui permet une exploitation significative du modèle souris. In vitro les anticorps humains immuno purifiés sur DG729 sont capables, même à très faibles concentrations, de bloquer la pénétration des sporozoïtes de P. yoelii dans les hépatocytes murins. In vivo les souris immunisées par DG729 sont totalement ou
10 partiellement protégées contre les infections par les sporozoïtes de P. yoelii;

e) enfin, certains épitopes notamment dans les parties non répétées de la molécule stimulent la sécrétion d'interféron γ par les monocytes, ce médiateur permettant d'inhiber le développement intra-hépatique du
15 parasite (S. Mellouk et al, The Jour. of Immun. 139, 4192-4195, 1987).

f) la séquence de la région de LSA-3 correspondant à un (lipo) peptide NR2 a été analysée dans 27 échantillons : 4 souches de laboratoire (NF54, K1, Palo Alto, T9/96), 3 isolats malgaches, 3 isolats birmans, 5 isolats brésiliens, 7 isolats ivoiriens et 5 isolats thaïs. Aucune mutation
20 n'a été observée sur les 300 paires de bases analysées, soit 100 % de conservation dans cette région immunologiquement importante contenant un ou plusieurs épitopes B, Th et CTL.

g) des informations sur la structure de l'antigène, et notamment d'un peptide RE, et plus particulièrement sur la région répétée centrale à partir
25 de laquelle le peptide RE a été conçu et qui comporte un ou plusieurs épitopes B majeurs, ont été obtenues à partir du Hydrophobic Cluster Plot de la séquence disponible dans le clone T9/96 (630 acides aminés), (Gaboriot et al., (1987): Hydrophobic cluster analysis : an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences, FEBS
30 Letters, 224 : 149-155) ; cette méthode prédit une très forte propension à l'organisation en hélice- α . La région répétée présente une extraordinaire

régularité dans l'espacement des résidus de Valine et d'Isoleucine, alternant avec des résidus acides ou de Proline. La disposition des groupements hydrophobes à la surface de cette hélice évoque une bordure hydrophobe se décalant graduellement d'une face de l'hélice à l'autre, suivant une orientation générale constante le long de la molécule, et probablement en relation avec une structure ou un emballage « coiled-coil » comme cela apparaît dans la figure 4b qui représente le HCP (Hydrophobic Cluster Plot) de la séquence peptidique du clone DG729.

h) après avoir démontré qu'il existait une très large gamme de réponses immunitaires à l'antigène LSA-3, nous avons analysé la capacité des cellules répondeuses à se localiser autour des parasites dans le foie. Chez les souris immunisées par les antigènes recombinants, l'injection par voie intraportale de chacun des peptides absorbés sur des billes de polystyrène de 10µm permet de visualiser au bout de 48 heures un afflux de lymphocytes autour de l'antigène (mimant le parasite), puis au 5ème jour, un important recrutement de cellules appartenant à la lignée macrophagique.

Toutes ces propriétés dont certaines seront démontrées en détail dans les expériences décrites plus loin montrent que l'antigène LSA-3 présente à la fois une bonne antigénicité et une bonne immunogénicité.

Les inventeurs ont pu confirmer et préciser la spécificité des stades d'expression de la molécule ; au niveau des sporozoïtes, cette expression a été confirmée par l'immunofluorescence en surface de plusieurs souches et isolats. En analyse par « Western Blot » (ou Immunoempreinte), la molécule LSA-3 apparaît comme une protéine d'un poids moléculaire de 200 000 daltons. Si les ARN messagers de sporozoïtes n'ont pu être obtenus en quantité suffisante pour une analyse en « northern blot », des expériences de PCR inverse ont confirmé l'expression de LSA-3 à ce stade. Au niveau des hépatocytes infectés, LSA-3 est observé dans la vacuole parasitophore du parasite par immunofluorescence à l'aide

d'anticorps contre les régions répétées et non répétées de la protéine, ainsi qu'en microscopie électronique.

Un fragment de LSA-3 dénommé 729S ainsi que trois peptides dénommés NRI et NRII inclus dans la partie non répétée, et 729 R inclus dans la partie répétée ont été décrits dans la demande WO 92/13884. Néanmoins ce document n'évoque pas les propriétés particulières mentionnées ci-dessus ni d'autres fragments de LSA-3 qui pourraient être soit plus longs soit plus courts, inclus ou combinés avec ces fragments qui présenteraient des propriétés particulièrement intéressantes pour une utilisation dans des vaccins.

L'invention a pour objet des molécules polypeptidiques contenant au moins dix acides aminés consécutifs de la séquence d'acides aminés montrée dans la figure 2 et dénommée SEQ ID n° 2, et représentant LSA-3, les polypeptides suivants étant exclus :

- RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHNV
- VEESVEENDEESVEENVEENVENNDDGSVASSVEESIASSVDESIDSSIE -
- ENVAPTVEEIVAPTVEEIVAPSVVEKCAPSVVEESVAPSVVEESVAEMLKER
- (729S)
- RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHN
- DELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQ, (NR I)
- LEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHNV, (NR II)
- VESVAPSVVEESVAPSVVEESVAENVEESV. (729 RE)

D'autres molécules selon l'invention contiennent au moins 20 acides aminés consécutifs ou au moins 50.

L'ensemble de ces polypeptides et la molécule LSA-3 sont dans tout ce qui suit « polypeptides de l'invention ».

Les résultats expérimentaux et les comparaisons de séquence non répétées entre différents isolats de P. falciparum indiquent l'existence d'une homologie d'au moins 70% entre des antigènes équivalents du stade hépatique du parasite. Aussi toute molécule peptidique présentant au moins 70% d'homologie avec une quelconque des molécules définies ci-

dessus fait partie de l'invention, ainsi que celles présentant au 70% d'homologie avec la séquence suivante :

Leu Leu Ser Asn Ile Glu Glu Pro Lys Glu Asn Ile Ile Asp Asn Leu Leu Asn Asn Ile (CT1)

- 5 comprise entre les acides aminés 140-159 de K1 ou 23-42 du T9/96.

De la même façon font partie de l'invention les molécules polypeptidiques présentant au moins 70% d'homologie avec la séquence représentée dans la figure 3 qui représente une partie de LSA-3 dans T9/96 : l'ADN de cette isolat de P.falciparum a été digéré par des enzymes de restriction puis
10 cloné dans lambda gt11 et a ainsi permis de constituer la génothèque de cette isolat déjà décrite plus haut.

Des conjugués constitués d'un polypeptide issu de LSA-3 lié de façon covalente par un pont lysine à des résidus lipidiques saturés ou insaturés font également partie de l'invention, plus particulièrement lorsque
15 le résidu lipidique est un palmitoyl ou un palmityl ou un oléyl. Des résidus en C16 ou C18 ont ainsi été couplés par un pont lysine aux peptides NRI, NRII, 729 RE et CT1 déjà représentés ci-dessus. La méthode de synthèse utilisée pour ces conjugués est décrite dans Bourgault, Journal of Immunology, 149, 3416 (1992) et Rouaix, Vaccine, 12, 1209 (1994).

20 L'invention porte également sur des compositions immunogènes contenant au moins une molécule polypeptidique ou un conjugué décrits ci-dessus, ainsi que sur les vaccins contenant ces compositions immunogènes. D'autres épitopes immunogènes notamment LSA-1, SALSA, STARP ont déjà été décrits dans EP A-0407230 et dans WO 92/13884 Les
25 compositions de vaccin selon l'invention peuvent contenir de façon avantageuse un mélange de peptides immunogènes issus de LSA-3 et des peptides ou antigènes issus de LSA-1, SALSA ou STARP ; un mélange plus particulièrement intéressant pourrait être celui constitué d'une part de NRI, NRII ou de LSA-3 entier, couplés ou non à un résidu lipidique, et
30 d'autre part des peptides SALSA-1 ou SALSA2 ou l'antigène SALSA couplé ou non à un résidu lipidique.

Toutes les molécules polypeptidiques répondant à la définition ci-dessus et présentant au moins 70% d'homologie avec les polypeptides LSA-3, CT1, NRI, NRII ou 729RE, peuvent être combinées de façon homologue ou hétérologue avec d'autres séquences peptidiques ou issues d'un autre antigène des différents stades de P.falciparum.

Par 70 % d'homologie des séquences, il est bien entendu qu'il s'agit d'une homologie de séquences par rapport à l'un quelconque des isolats dont la séquence est connue ou susceptible d'être connue, et non pas globalement entre l'ensemble des isolats. En effet, la région répétée centrale de LSA-3 (bloc 2 de la figure 4) présente un nombre variable de séquences répétées responsables d'une variabilité d'un isolat à l'autre comme l'indique d'ailleurs la représentation de la figure 4 dans laquelle la différence de longueur entre les parties répétées du bloc 2 des isolats T9/96 et K1 est flagrante bien que les tétrapeptides qui constituent cette région répétée (VEES, VEEN, VEEI, VAPS, VAPT, etc...) soient très bien conservés. En revanche, les séquences répétées du bloc 1 sont parfaitement conservées entre les deux isolats. Aussi compte tenu de la variabilité intrinsèque de ce bloc 2 d'un isolat à l'autre, la définition 70 % d'homologie s'entend pour l'antigène LSA-3 des différents isolats à l'exclusion des séquences répétées du bloc 2.

L'invention porte également sur les anticorps polyclonaux ou monoclonaux qui reconnaissent spécifiquement les molécules polypeptidiques de l'invention.

Ces molécules de l'invention peuvent être utilisées pour la mise en oeuvre de méthodes de diagnostic et la fabrication de trousse permettant de détecter l'existence de l'infection par P.falciparum ; cette méthode peut être soit un dosage d'anticorps spécifiques circulant par la mise en oeuvre de méthodes sérologiques classiques par mise en contact d'un des antigènes ci-dessus avec un fluide biologique de l'individu en question, soit des méthodes de dosages d'antigènes en utilisant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux obtenus par des méthodes classiques

d'obtention de tels anticorps par les antigènes correspondants. Dans les coffrets ou kits des diagnostics de l'invention, les réactifs permettant la détection des complexes antigènes/anticorps produits, pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué sont présents. Selon que l'on souhaite réaliser un test antigène ou un test sérologique, le kit comprend soit les anticorps soit les antigènes de l'invention.

L'invention porte également sur toutes les séquences de nucléotides codant pour un polypeptide de l'invention ainsi que sur tout
10 acide nucléique recombinant contenant au moins une séquence de nucléotides de l'invention, insérée dans un acide nucléique hétérologue vis à vis de ladite séquence de nucléotides.

Font partie de l'invention les séquences d'acides nucléiques codant pour LSA-3 ou ses fragments immunogènes et répondant à l'une des
15 définitions suivantes :

- (a) l'enchaînement de nucléotides tel que représenté dans SEQ ID n° 1 de la figure 1, ou
- (b) l'enchaînement de nucléotides représenté dans SEQ ID n° 2 de la figure 2,
- 20 (c) un enchaînement présentant au moins 70% d'homologie avec celui de la figure 1, ou de la figure 2 ou,
- (d) un enchaînement de nucléotides complémentaires à ceux présentés en (a), (b) ou (c).

Par codant pour LSA-3, on entend tant le gène représenté dans SEQ
25 ID n° 1 de la figure 1 que le cDNA représenté dans SEQ ID n° 2 de la figure 2.

L'invention concerne plus particulièrement un acide nucléique recombinant, dans lequel la séquence de nucléotides de l'invention est précédée d'un promoteur (notamment un promoteur inductible) sous le
30 contrôle duquel la transcription de ladite séquence est susceptible d'être

effectuée et, le cas échéant, suivie d'une séquence codant pour des signaux de terminaison de la transcription.

L'invention porte également sur la séquence codante issue du clone T9/96, représenté sur la figure 3 par la SEQ ID n° 3.

5 Dans cette séquence, le fragment CT1 est compris en le nucléotide 67. et 126, et la fragment 679 comment au nucléotide 206 et le fragment 729 RE est compris entre les nucléotides 547 et 630.

L'invention porte enfin sur tout vecteur recombinant, utilisé en particulier pour le clonage d'une séquence nucléotidique de l'invention, et/ou pour l'expression du polypeptide codé par cette séquence, et
10 caractérisé en ce qu'il contient un acide nucléique recombinant, tel que défini ci-dessus, en l'un de ses sites non essentiel pour sa réplication.

A titre d'exemple de vecteur sus-mentionné, on citera les plasmides, les cosmides, les phages ou les virus.

15 A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement le plasmide pK 1.2. déposé à la CNCM sous le n°I-1573.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un polypeptide de l'invention, par transformation d'un hôte cellulaire à l'aide d'un vecteur recombinant de type sus-indiqué, suivie de la mise en culture
20 de l'hôte cellulaire ainsi transformé, et de la récupération du polypeptide dans le milieu de culture.

Ainsi, l'invention concerne tout hôte cellulaire transformé par un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus, et comprenant les éléments de régulation permettant l'expression de la séquence de nucléotides
25 codant pour un polypeptide selon l'invention.

L'invention porte de même sur des amorces d'ADN (ou d'ARN) utilisables dans le cadre de la synthèse de séquences nucléotidiques et/ou polypeptidiques de l'invention, par la technique du PCR (Polymerase Chain Reaction) ou toute autre méthode aujourd'hui connue pour amplifier
30 les acides nucléiques telles la LCR, CPR, ERA, SPA, NASBA, etc...

L'invention concerne toute amorce d'ADN ou d'ARN, caractérisée en ce qu'elle est constituée d'environ 10 à 25 nucléotides, identiques ou complémentaires aux 10 à 25 premiers nucléotides de la séquence de nucléotides codant pour une séquence peptidique selon l'invention ou
5 identiques aux 10 à 25 derniers nucléotides de ladite séquence.

Ainsi la présente invention porte également sur un procédé de préparation d'un polypeptide de l'invention comprenant les étapes suivantes :

- le cas échéant, l'amplification préalable par des techniques classiques de
10 la quantité de séquences de nucléotides codant pour ledit polypeptide à l'aide de deux amorces d'ADN choisies de manière appropriée,
- la mise en culture, dans un milieu de culture approprié, d'un hôte cellulaire préalablement transformé par un vecteur contenant un acide nucléique selon l'invention comprenant la séquence nucléotidique codant
15 pour ledit polypeptide, et
- la récupération, à partir du susdit milieu de culture du polypeptide produit par ledit hôte cellulaire transformé.

A titre d'exemple d'amorces d'ADN ou d'ARN selon l'invention, on citera les couples de séquences suivants :

20 S1 : GTGATGAACTTTTAAATGAATTATTA AAA (SEQ ID n° 4)

S2 : TGTTGTTCTTGTTGAACACTTTTACTAA (SEQ ID n° 5)

dont les positions respectives sur le gène LSA-3/K1 représente sur la figure 1 sont de 695 à 722 et de 829 à 799 (en lecture inverse), ou le couple :

25 6.1 : GGTATCGAACTGAGGAAATAAAGG (SEQ ID n° 6)

6.2 : CATAGCAGGAACATCAACATCCAC (SEQ ID n° 7)

dont les positions respectives sont 2668 à 2692 pour 6.1. et 3456 à 3433 pour 6.2. (lecture inverse).

Les informations sur les séquences ID n° 4, ID n° 5, ID n° 6 et
30 ID n° 7 sont détaillées à la fin de la description.

Les peptides de l'invention peuvent également être préparés par les techniques classiques de la synthèse de peptides. Cette synthèse peut être réalisée en solution homogène ou en phase solide. Par exemple, on aura recours à la technique de synthèse en solution homogène décrit par Houbenweyl dans l'ouvrage intitulé « Methode der Organischen Chemie » (Méthode de la Chimie Organique édité par E. Wunsch, vol. 15-I et II. Thieme, Stuttgart 1974 ou celle décrite par R.D. Merrifield dans l'article intitulé « Solid phase peptide synthesis » (J. Am. Chem. Soc., 45, 2149-2154).

10 L'invention porte également sur les oligomères hydrosolubles des peptides monomères sus-indiqués.

L'oligomérisation peut provoquer un accroissement de l'immunogénicité des peptides monomères selon l'invention. Sans qu'une telle indication chiffrée puisse être considérée comme limitative, on mentionnera néanmoins que ces oligomères peuvent, par exemple, 15 contenir de 2 à 10 unités monomères.

On peut avoir recours, pour réaliser l'oligomérisation, à toute technique de polymérisation couramment utilisée dans le domaine des peptides, cette polymérisation étant conduite jusqu'à l'obtention d'un 20 oligomère ou polymère contenant le nombre de motifs monomères requis pour l'acquisition de l'immunogénicité désirée.

Une méthode d'oligomérisation ou de polymérisation du monomère consiste dans la réaction de celui-ci avec un agent de réticulation tel que le glutaraldéhyde.

25 On peut également avoir recours à d'autres méthodes d'oligomérisation ou de couplage, par exemple à celle mettant en jeu des couplages successifs d'unités monomères, par l'intermédiaire de leurs fonctions terminales carboxyle et amine en présence d'agents de couplage homo- ou hétéro-bifonctionnels.

30 L'invention concerne encore les conjugués obtenus par couplage covalent des peptides selon l'invention (ou des susdits oligomères) à des

molécules porteuses permettant notamment d'argumenter l'immunogénicité (naturelles ou synthétiques), physiologiquement acceptables et non toxiques, par l'intermédiaire de groupements réactifs complémentaires respectivement portés par la molécule porteuse et le peptide. A titre
5 d'exemple de molécules porteuses ou supports macromoléculaires entrant dans la constitution des conjugués selon l'invention, on mentionnera des protéines naturelles, telles que l'anatoxine tétanique, l'ovalbumine, des sérums albumines, des hémocyanines, le PPD de la tuberculine (PPD : « Purified Protein Derivative »), etc...

10 A titre de supports macromoléculaires synthétiques, on mentionnera par exemple des polylysines ou des poly(D-L-alanine)-poly(L-lysine).

A titre de supports hydrocarbonés ou lipidiques, on mentionnera les acides gras, saturés ou insaturés, et préférentiellement ceux en C16 ou
15 C18 de type oleyl ou palmitoleyl.

Enfin et sans être limitatifs, les antigènes ou peptides selon l'invention peuvent être couplés à des supports classiques ou adsorbés sur de tels supports notamment des microsphères ou billes de latex ou de polystyrène, ou incorporés dans des particules Ty1.

20 Pour synthétiser les conjugués selon l'invention, on peut avoir recours à des procédés connus en soi, tels que celui décrit par Frantz et Robertson dans *Infect. and Immunity*, 33, 193-198 (1981), ou celui décrit dans *Applied and Environmental Microbiology*, (octobre 1981), vol. 42, n° 4, 611-614 par P.E. Kauffman en utilisant le peptide et la molécule
25 porteuse appropriée.

Les acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés soit par un procédé chimique, soit par d'autres procédés.

Un mode de préparation approprié des acides nucléiques comportant au maximum 200 nucléotides (ou 200 pb, lorsqu'il s'agit
30 d'acides nucléiques bicaténares) de l'invention comprend les étapes suivantes :

- la synthèse d'ADN n utilisant la méthode automatisée des β -cyanethylphosphoramidite décrite dans Bioorganic Chemistry 4; 274-325 (1986),
- le clonage des acides nucléiques ainsi obtenus dans un vecteur approprié et la récupération de l'acide nucléique par hybridation avec une sonde appropriée.

Un mode de préparation, par voie chimique, d'acides nucléiques de longueur supérieure à 200 nucléotides a déjà été décrit dans WO 92/13884.

- 10 L'invention concerne également des trousse de diagnostic qui comportent une ou plusieurs amorces d'amplification spécifiques du gène LSA-3 et permettant de détecter la présence du gène ou du mRNA chez un individu susceptible d'être infecté par P.falciparum.

- 15 L'invention porte aussi sur des compositions pharmaceutiques ou vaccinales dans lesquelles l'un au moins des produits selon l'invention se trouve associé à des excipients pharmaceutiquement acceptables, solides ou liquides, adaptés à la construction de formes orales, oculaires ou nasales, ou des excipients adaptés à la construction des formes d'administration rectale, ou encore avec des excipients gélamineux pour
20 l'administration vaginale. Elle concerne aussi des compositions liquides isotoniques contenant l'un au moins des conjugués selon l'invention, adaptées à l'administration sur les muqueuses, notamment oculaires ou nasales ou pulmonaires.

- Avantageusement, les compositions vaccinales selon l'invention
25 contiennent en outre un véhicule, tel que la polyvinyl-pyrrolidone, facilitant l'administration du vaccin. A la place de la polyvinyl-pyrrolidone, on peut utiliser tout autre type d'adjuvant au sens classique que l'on donnait autrefois à cette expression, c'est-à-dire d'une substance permettant l'absorption plus aisée d'un médicament ou facilitant son action dans
30 l'organisme. A titre d'exemples d'autres adjuvants de ce dernier type, on mentionnera encore la carboxyméthyl-cellulose, les hydroxydes et

phosphates d'aluminium, la saponine ou tous autres adjuvants de ce type, bien connus de l'homme de l'art. Enfin, elles contiennent si besoin un adjuvant immunologique, notamment du type muramylpeptide.

L'invention concerne aussi des compositions pharmaceutiques
5 contenant à titre de substance active l'un au moins des anticorps polyclonaux ou monoclonaux définis précédemment en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention porte enfin sur une méthode d'immunisation d'un individu susceptible d'être infecté par P. falciparum par injection d'une molécule
10 peptidique ou d'un oligomère tel que décrit précédemment, seul ou en association avec d'autres types de molécules susceptibles de protéger ledit individu contre une infection ultérieure, la molécule polypeptidique ou antigénique ou les lipopeptides naturels ou recombinants sont, soit utilisés seuls, soit adsorbés ou couplés à des microsphères ou billes de latex ou
15 de polystyrène.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore dans les exemples illustrés des figures qui suivent et montrent les caractéristiques particulières des molécules de l'invention par rapport à d'autres antigènes du stade pré-érythrocytaire du parasite.

20 La figure 1 représente la séquence ID n° 1 d'ADN génomique de 6152 paires de bases du gène LSA-3, elle est issue du clone K1.2 lui-même issu d'un isolat thaïlandais.

La figure 2 représente la séquence ID n° 2 du cDNA et la séquence polypeptidique de l'antigène LSA-3. La séquence de DNA représente 5361
25 paires de bases.

La figure 3 représente la séquence ID n° 3 de la partie séquencée dans le clone parasitaire T9/96 (1890 paires de bases), la ligne du haut étant la séquence nucléotidique et la ligne du bas la séquence peptidique. Dans ce clone, la séquence CT1 est comprise entre les nucléotides 67 et
30 126, le fragment DG 679 proprement dit commençant au nucléotide 207. Le fragment 729 RE est compris entre les nucléotides 547 et 629.

La figure 4a représente schématiquement les positionnements relatifs des séquences répétées et non répétées, des introns et des exons dans les souches K1 et T9/96, les clones 679 et 729 étant issus de ce dernier.

5 La figure 4b représente le HCP (Hydrophobic Cluster Plot) de la séquence peptidique du clone DG729.

La figure 5 représente les quantités d'immunoglobulines produites dans le sérum de chimpanzé Nuria avant et après l'immunisation par différents peptides de LSA-3.

10 La figure 6 indique le titre en anticorps spécifique de différentes espèces de souris immunisées soit avec un peptide soit avec un lipopeptide correspondant.

La figure 7 montre l'inhibition de l'invasion des cellules hépatiques par les sporozoïtes par des sérums hyper-immuns obtenus après
15 immunisation par différents peptides immuno-purifiés contre du LSA-3 entier.

La figure 8 représente la comparaison d'un antigène issu de LSA-3 avec deux autres antigènes sur l'immunité de type T.

La figure 9 représente l'induction de l'interféron- γ chez les
20 chimpanzés Gerda et Dirk par les peptides issus de la molécule LSA-3.

La figure 10 représente les résultats de lymphoprolifération des PBMC d'un individu protégé par injection de sporozoïtes irradiés contre des peptides issus des antigènes LSA-1 et LSA-3.

Exemple 1 : Clonage et séquençage du gène LSA-3

25 1) séquençage

Le criblage initial de la génothèque provenant du clone parasitaire T9/96 avec le sérum d'un missionnaire soigné de façon continue en prophylaxie nous a permis d'isoler 120 clones correspondant à des molécules exprimées au stade sporozoïte et/ou hépatique du cycle de P.falciparum.

30 Le clone 729S a été utilisé comme sonde pour cribler une banque génomique de la souche K1 thaïlandaise déjà citée plus haut qui contient

de grands fragment Eco R1 clonés dans le phage lambda gt10. Un insert de 6,85 kilobases contenant le gène entier a été purifié de cette génothèque et recloné dans un plasmide pUC18 pour séquençage et caractérisation. Chez P.falciparum dont le génome est très riche en base A :T (80%), cette approche est souvent rendue difficile par la rareté des sites de restriction utilisables et par l'instabilité ou même l'impossibilité de cloner certains fragments lorsqu'ils sont insérés en vecteurs plasmidiques.

La structure du gène est représentée dans la figure 4 et présente les caractéristiques suivantes :

- a) un mini exon 1 codant à son extrémité 3' pour un peptide signal hydrophobe ;
- b) un court intron (168 paires de bases) inclus entre des sites consensus de donneurs et accepteurs de splicing ;
- c) un deuxième exon de cinq kilobases qui code pour une région organisée de 1,8 kilobases et composé d'un arrangement de 7 blocs de 4 amino acides, et d'une région hydrophobe en 3' qui pourrait correspondre à un encrage du type glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI).

Une investigation détaillée du polymorphisme du LSA-3 a été réalisée en séquençant le clone 679 qui contient l'essentiel des séquences répétées du gène LSA-3 et une portion de 1 kilobase de la fraction non répétée en 3', la séquence de ce fragment étant représentée dans la figure 3 entre les nucléotides 207 et 1890.

Les répétitions de la souche K1 sont les suivantes :

Bloc 1 : (aa223) VEEK VEES VEEN DEES VEEN VEEN VEEN DDGS
VASS VEES IASS VDES IDSS IEEN (aa278)

Bloc 2 : (aa279) VAPT VEEIVAPS VVESVAPS VEESVEEN
VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN
VEEIVAPT VEEIVAPT VEEIVAPS VVESVAPS VEESVEEN
VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN
VEEIVAPT VEEIVAPT VEEIVAPS VVESVAPS VEESVEEN

VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN
 VEESVAEN VEESVAEN
 VEEIVAPT VEEIVAPT VEEIVAPS WESVAPS VEESVEEN
 VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN
 5 VEEIVAPT VEEIVAPT VEEIVAPS WESVAPS VEESVEEN
 VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN
 VEEIVAPT VEEIVAPT VEEIVAPS WESVAPS VEESVEEN
 VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN
 VEEIVAPT VEEIVAPT VEEIVAPS WESVAPS VEESVEEN
 10 VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN
 VEESVAPT VEEIVAPS VEESVAPS VEESVAEN (aa818)

Bloc 3 :

(aa1537)DEDI EEDV EEDI EEDI EEDK VEDI DEDI DEDI GEDK DEVI
 15 (aa1576)

Les répétitions dans le clone T9/96 telles que déterminées dans la
 demande de brevet n° FR 9101286 du 05 février 1991, sont les suivantes :

Bloc 1 : VEEK VEES VEEN DEES VEEN VEEN VEEN DDGS VASS VEES
 IASS VDES IDSS IEEN

20

Bloc 2 : VAPT VEEIVAPT VEEIVAPS WESVAPS VEESVAPS
 VEESVAEN VEESVAEN
 VEEIVAPS

VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN
 25 VEEIVAPT VEESVAPT VEEIVAPT VEESVAPT VEEIVAPS VEESVAPS
 VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN VEESVAEN
 VEEIVAPS VEEIVAPT
 VEESVAEN

L'exon 2 du gène LSA3 comporte 2 régions répétées pouvant être
 30 décomposées en 3 blocs comme indiqué sur la figure 4 :

- le bloc 1, codant pour un enchaînement de 14 tétrapeptides. Ce bloc est conservé à 100% en acides aminés et en acides nucléiques entre T9/96 et K1. Seuls les tétrapeptides VEES et VEEN sont retrouvés dans le bloc 2.
- le bloc 2 code, dans K1, pour 127 tétrapeptides correspondant à
 35 l'enchaînement de différents octapeptides, eux-mêmes formés par

combinaison de 2 des 7 tétrapeptides ou motifs de base (VEES, VVES, VEEN, VEEI, VAEN, VAPS, VAPT). Le nombre de répétitions et l'arrangement de ces octapeptides varient selon les motifs et semblent être spécifiques du clone K1.2. En effet, dans le clone T9/96, le bloc 2 (53
5 tétrapeptides) correspond également à l'enchaînement d'octapeptides formés à partir des 7 mêmes tétrapeptides de base (et d'un 8ème motif WVPS n'existant pas dans K1), mais avec un nombre et un arrangement différents de ces répétitions.

- le bloc 3 est constitué de l'enchaînement de 10 tétrapeptides dégénérés et différents de ceux des blocs 1 et 2. Ce bloc a été séquencé uniquement
10 dans la souche K1. Cependant, des résultats préliminaires obtenus par PCR avec le clone T9/96 et plusieurs autres souches de laboratoire indiquent qu'il n'existe pas de polymorphisme de taille dans cette région.

Les régions non-répétées de l'exon 2 sont particulièrement bien
15 conservées. En effet, la comparaison de séquence entre T9/96 et K1 a pu être faite sur 315 bp en 5' du bloc 1 et sur 763 bp en 3' du bloc 2. L'homologie est de 99,4% en acides nucléiques et 98,6% en acides aminés.

La comparaison des séquences du clone 679 issu du clone de
20 P.falciparum T9/96, et de la séquence correspondante du LSA-3 issue de l'isolat K1 montre que le gène est bien conservé, les différences les plus notables étant observées dans la région répétée où les blocs de 4 amino acides sont bien conservés mais varient dans leur nombre et leur organisation.

25 Au contraire les parties 5' et 3' non répétées apparaissent comme particulièrement bien conservées montrant jusqu'à 100% d'homologie dans la région 5' où des épitopes B et T ont déjà été identifiés.

Des amplifications d'ADN, notamment par PCR de différentes souches de P.falciparum avec 8 paires d'amorces réparties sur l'ensemble
30 du gène LSA-3 ont montré que, excepté avec celles entourant les régions répétées, tout le génome donne des produits PCR de taille similaire ce qui suggère que l'antigène LSA-3 est bien conservé.

Diverses sondes LSA-3, choisies dans les régions répétées et non répétées, ont été hybridées à faible stringence avec les ADN de différentes espèces de Plasmodium et n'ont permis d'identifier aucun gène homologue à LSA-3, sauf chez le parasite de chimpanzé P.reichenowii, ce
5 qui confirme la proche parenté de cette espèce avec P.falciparum.

De façon surprenante, l'antigène analogue à LSA-3 trouvé dans P. yoelii, qui donne clairement des réactions immunologiques croisées à la surface du sporozoïte avec des anticorps contre le fragment 729S, ne semble pas être conservé au niveau de la séquence nucléotidique. Enfin la
10 comparaison des séquences LSA-3 avec les bases de données n'a révélé aucune homologie avec des molécules connues, à l'exception de la région répétée dont certains motifs présentent une forte analogie avec les répétitions d'un gène de Staphylococcus xylois, mais aussi avec deux antigènes de P.falciparum, RESA et Pf11.1, tous deux exprimés au cours
15 du stade sanguin du parasite. Cette homologie est essentiellement due à la richesse en séquences « glu-glu » de ces antigènes et des répétitions de LSA-3.

2) Clonage :

L'insert DG729 et d'autres régions de l'exon 2 de la souche K1 ont
20 été clonés dans un vecteur d'expression procaryotique pGEX, vecteur commercialisé par la société In VitroGene Corp (San Diego USA). Ce vecteur produit une protéine de fusion avec la glutathion -S-transférase (GST) de Schistosoma mansoni et permet une purification facile des protéines recombinantes par affinité des billes de glutathion-agarose. Les
25 peptides d'expression à partir de ces vecteurs sont nommés :

- pour la protéine LSA-3 entière : protéine REC,
- ou pour le fragment 729S : 729PGEX.

Les tentatives de clonage d'autres fragments notamment le fragment 1-5 3NSREP, 3NFREP, 5NR, et 5SNREP ont posé des difficultés
30 concernant soit le clonage soit la production et la purification des protéines en quantité suffisante pour des expériences d'immunisation.

Seuls les fragments 729, NN et 3PC ont permis de produire et de purifier des polypeptides recombinants correspondants en quantité suffisante pour l'analyse de l'antigénicité de la molécule.

Exemple 2 : Protection de chimpanzés immunisés contre des injections d'épreuve à faible ou forte dose :

2.1. Un chimpanzé Dirk préalablement immunisé par une fraction de LSA-3 en combinaison avec un autre antigène du même stade de développement du parasite, et présentant les effets décrits plus haut au point a), a été re-immunisé quelques années plus tard par des peptides et des protéines recombinantes correspondant à la même combinaison d'antigènes. De nouveau, ce chimpanzé s'avère protégé contre une infection d'épreuve à faible dose (2.10^4 sporozoïtes) puis une infection d'épreuve à forte dose (5.10^6 sporozoïtes). Comme au cours du premier challenge, on observe une réduction importante du nombre de schizontes détectés dans le foie après le challenge à forte dose ainsi qu'un infiltrat lympho-monocytaire autour des rares schizontes détectables (témoin d'une défense locale).

2.2. Protection partielle du chimpanzé Gerda : un autre chimpanzé a été immunisé uniquement par l'antigène LSA-3 (animal décrit dans les exemples 7 et 8 ci-après), à savoir le lipopeptide NR2 puis les protéines recombinantes (GST-729, GST-NN, GST-3PC) qui couvrent à elles trois 95 % de la molécule LSA-3 et adsorbées sur microsphères de latex. Cet animal s'avère être partiellement protégé contre une infection d'épreuve à forte dose (8.10^6 sporozoïtes) puisqu'il présente une très faible parasitémie sanguine et une réduction de 90 % du nombre de schizontes hépatiques par rapport au contrôle suite à l'infection d'épreuve.

2.3 Protection partielle du chimpanzé Nuria : un chimpanzé immunisé par une fraction de l'antigène LSA-3 seul, à savoir une combinaison de peptides, de lipopeptides puis de protéines recombinantes correspondant à 95 % de la molécule LSA-3 et émulsifiées dans le Montanide ISA-51 (SEPPIC, 75 Quai d'Orsay, France), s'avère être

partiellement protégé contre une infection d'épreuve à dose moyenne (1.10^5 sporozoïtes). En effet, cet animal présente un retard significatif de l'apparition des parasites dans le sang par rapport à 4 témoins (chimpanzés immunisés par les antigènes pré-érythrocytaires LSA-1, SALSA ou STARP, et 1 animal témoin non immunisé), une parasitémie sanguine maxima plus faible et une chute de parasitémie plus rapide (24 heures au lieu de 3 jours), résultats qui traduisent une forte réduction du nombre de formes hépatiques induites chez cet animal par l'infection d'épreuve et en accord avec les résultats obtenus chez Gerda. Dans ce cas, l'examen des formes hépatiques n'a pas été réalisé.

2.4 Immunogénicité B, T chez les chimpanzés Demi, Karlien et Iris : Trois chimpanzés immunisés par les peptides LSA-3-NR1 et -RE et les lipopeptides -NR2 et -CT1, ainsi que par des peptides correspondant, pour chaque animal, à un autre antigène pré-érythrocytaire (LSA-1, SALSA ou STARP) présentent tous les 3 :

- des réponses humorales élevées contre les épitopes B présents sur les peptides NR1, NR2 et RE. Les anticorps reconnaissent non seulement les peptides et les recombinants mais sont aussi fortement positifs sur les molécules natives du parasite, ce qui est apprécié par immunofluorescence sur les sporozoïtes et les stades hépatiques de Plasmodium falciparum (mais négatifs vis-à-vis des stades érythrocytaires) ;
- des réponses lymphoprolifératives élevées et spécifiques contre les 4 peptides LSA-3 ainsi que les épitopes T natifs présents à la surface des sporozoïtes de Plasmodium falciparum et de Plasmodium yoelii, chez lequel LSA-3 possède un homologue (non encore caractérisé).

Les réponses B et T vis-à-vis des antigènes natifs sont un point important car :

- a) elles prouvent la bonne représentativité des molécules synthétiques ;
- b) elles signifient qu'au moment de l'infection, il y a de bonnes chances d'obtenir une réponse secondaire anamnétique ; c'est de fait ce qui a été

observé chez le chimpanzé Nuria au moment du challenge. L'importance de cette observation est confortée par le fait que la même réponse secondaire n'a pas été obtenue vis-à-vis des autres antigènes tels que LSA-1 et STARP.

- 5 2.5. Immunogénicité chez l'Aotus : un singe-hibou (*Aotus trivirgatus*)
immunisé par les 2 peptides LSA-3-NR1 et -RE et les 2 lipopeptides -NR2
et -CT1, puis re-stimulé par les protéines recombinantes correspondant à
95 % de la molécule LSA-3 et adsorbées sur microsphères comme décrit
ci-dessus, présente des réponses lymphoprolifératives élevées et
10 spécifiques contre les épitopes T présents sur ces mêmes peptides.

Pour ce qui est de la réponse in vivo des différents chimpanzés
ainsi pré-immunisés, les résultats soulignent l'excellente immunogénicité
(B et T) de LSA-3, sous forme peptide, lipopeptide et recombinants, et
dans tous les modèles animaux testés jusqu'à présent, soit 6/6 chimpanzés
15 (outbred), 1/1 aotus, et chez toutes les souris immunisées (>20). Notons
que les résultats des formulations lipopeptidiques (qui peuvent être
utilisées chez l'Homme) ont été obtenus par injections sous-cutanées en
l'absence de tout adjuvant.

Exemple 3 : Identification d'épitope CTL

- 20 La méthode utilisée pour identifier les CTL est celle décrite dans Fidock et
al, (1994), J. Immunol. 153 : 190 ou dans Bottius et al, (1996), J. Immunol
156 :2874-2884.

Des épitopes CTL (pour lymphocytes T cytotoxiques) ont été identifiés
dans les peptides NR2, RE et CT1 grâce à des tests de cytotoxicité
25 effectués à partir des PBMC des chimpanzés Dirk, Gerda, Nuria, Demi,
Karlien et Iris décrits plus haut.

Chez l'homme, 8 épitopes CTL additionnels, dont 7 situés dans la région 3'
non-répétée, ont pu être mis en évidence à partir des PBMC d'individus
appartenant à 3 haplotypes différents (MHC classe 1-A2, -B8 et -B53) et
30 vivant en région d'endémie (Gambie) (résultats non publiés). De plus, le
séquençage des 2 épitopes CTL restreints par B53 a démontré une

parfaite conservation de leurs séquences nucléotidique et peptidique dans plusieurs souches du Kenya et de Gambie.

Au total, nous avons identifié 11 épitopes CTL dans la molécule LSA-3, ce qui est considérable. Par ailleurs, 5 chimpanzés/6 ont développé des
5 réponses CTL contre le peptide NR2 après immunisation par le lipopeptide NR2 sans adjuvant, ce qui est un résultat remarquable pour des animaux non-consanguins. D'autre part, dans la mesure où les anticorps développés par Nuria ne présentaient aucune activité inhibitrice de l'invasion des sporozoïtes de Plasmodium falciparum, on peut supposer
10 que la protection observée dépendait des réponses cellulaires, en particulier des CTL.

Exemple 4 : Comparaison des titres anticorps avant ou après immunisation par différents peptides

4.1. Comparaison des réponses en anticorps induites par différents
15 peptides dans différents animaux immunisés.

La méthode utilisée est celle décrite dans Behr et al, (1992), J. Immunol 149 : 3321.

La réactivité est exprimée en ratio Elisa, c'est-à-dire la densité optique mesurée à 496 nanomètres du sérum après immunisation rapporté
20 à la densité optique du même sérum avant immunisation. La première colonne indique l'animal immunisé, la deuxième colonne l'immunogène reçu par l'animal, la 3ème colonne indique le nombre d'injections réalisées ainsi que le support accompagnant le peptide injecté : RP signifie protéine recombinante, RP/B signifie protéine recombinante adsorbée sur billes de latex, P signifie peptide et LP lipopeptide. Il faut préciser en outre que les
25 lipopeptides sont injectés dans du sérum physiologique, les peptides et les protéines recombinantes sont adsorbés sur les billes de latex ou dans une émulsion avec un adjuvant montanide ISA-51.

tableau I : REACTIVITE ANTICORPS DES DIFFERENTS PEPTIDES EXPRIMEE EN RATIO ELISA

		LSA1				SALSA				STARP				LSA3			
s	Chimpanzé e Immunogèn bre et type d'injection	LSA-	LSA-	LSA-	LSA-	SALSA	SALSA	SALSA	STARP-	STARP-	STARP-	LSA 3	LSA 3	LSA 3	LSA 3	R32T	
		REP	J	-NR	TER	-1	-2	M	R	-CT1	NR1	NR II	-REP	et 32			
Animaux immunisés																	
DIRK	LSA3 et LSA1 3 RP (d) 3 RP + 3 (P + LP)	7.4	9.0	0.9	0.8	nd	nd	0.5	0.7	1.7	1.0	1.1	8.8	0.7			
		20.0	10.0	0.1	0.4	0.2	1.1	1.0	0.6	1.0	1.1	3.1	17.0	0.8			
GERDA	LSA3 3LP 3LP + 3 RP/B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.9	nd	0.6			
		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.7	1.1	3.0	12.3	0.9			
DEMI	LSA3 et LSA1 2 (P+LP) 3 (P+LP) 3 (P+LP)+ 3 RP/B	8.0	14.1	0.7	16.4	0.6	1.1	nd	nd	0.7	1.5	11.7	19.1	0.7			
		8.4	14.5	1.6	21.5	0.8	0.2	nd	nd	0.8	5.1	14.2	20.7	1.2			
KAR- LIEN	LSA3 et SALSA 2 (P+LP) 3 (P+LP) 3 (P+LP)+ 3 RP/B	0.5	1.2	1.0	1.0	1.1	2.1	nd	nd	1.0	3.6	3.1	10.3	0.9			
		1.1	0.2	0.5	0.2	1.8	2.5	nd	nd	1.4	4.7	6.8	14.1	0.6			
IRIS	LSA3 et STARP 2 (P+LP) 3 (P+LP) 3 (P+LP)+ 3 RP/B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	10.1	15.9	0.7	2.4	6.7	12.5	0.6			
		nd	nd	nd	nd	nd	nd	10.5	16.4	1.3	3.1	6.8	15.3	0.5			
Contrôles non immunisés :																	
COR	β-GAL 3 RP	0.6	0.7	0.8	0.9	0.5	1.0	1.2	0.8	1.1	1.0	0.6	1.1	1.2			
PEER	β-GAL 6 RP	1.1	0.8	0.7	0.9	0.8	1.2	1.0	0.9	1.1	0.6	0.9	0.9	0.3			
BRAM	GST 2 RP 3 RP	1.1	0.6	0.5	1.1	0.3	0.8	0.9	1.2	1.1	0.3	0.4	0.7	1.0			
		0.8	0.3	0.8	1.3	0.7	1.2	1.1	1.2	1.6	0.2	1.3	0.6	0.4			
FOUAD	PBS	0.9	0.5	1.0	0.6	0.8	1.3	1.0	0.3	1.9	1.3	0.3	0.2	0.9			

4.2. Titre des anticorps obtenus :

Le tableau 2 représente les titres d'anticorps des sérums obtenus chez les chimpanzés par immunofluorescence sur les antigènes natifs
5 présents à la surface des différents stades (sporozoïques, hépatiques et sanguins) de P. falciparum, P. yoelii et P. berghei.

tableau II : TITRE EN ANTICORPS IMMUNOFLUORESCENTS

		P. falciparum				P. yoelii			(17XL et 17XNL)
CHIMPANZE	Antigène	SS (NF54)	LS (NF54 et 73OXI)	BS (150)	SS	LS	BS		
<u> Animaux immunisés </u>									
DIRK	LSA3 et LSA1	800	200	-(<100)	200	200	-(<100)		
GERDA	LSA3	400	200	-(<100)	400	200	-(<100)		
DEMI	LSA3 et LSA1	100	400	-(<100)					
KARLIEN	LSA3 et SALSA	100	200	-(<100)					
IRIS	LSA3 et STARP	400	100	-(<100)					
<u> Animaux témoins </u>									
COR	β-GAL	-(<100)	-(<100)	-(<100)	-(<100)	-(<100)	-(<100)		
BRAM	GST	-(<100)	-(<100)	-(<100)	-(<100)	-(<100)	-(<100)		
FOUAD	PBS	-(<100)	-(<100)	-(<100)	-(<100)	-(<100)	-(<100)		

- 4.3 Réponse lymphoproliférative des PBMC des différents chimpanzés après stimulation in vitro soit par les différents peptides soit par les antigènes natifs présents à la surface des sporozoïtes. Cette réponse a été mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans des PBMC (cellules de sang périphériques) soit après stimulation par les peptides LSA-3 (tableau III) ou après stimulation in vitro avec des sporozoïtes (tableau IV).

tableau III : INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE DANS DES PBMC APRES STIMULATION PAR LES PEPTIDES LSA-3

Chimpanzé	Immunogène	LSA3-CT1	LSA3-NRI	LSA3-NRII	LSA3-REP	MSP3-C (a)	PPPD(b)
<u>Animaux</u>							
<u>Immunisés</u>							
DIRK	LSA3 et LSA1	94 256 (4.0)	27 125 (8.5)	32 455 (10.7)	69 321 (32.3)	796 (1.0)	89 338 (50.3)
GERDA	LSA3	13 359 (25.1)	1 429 (2.8)	13 236 (25.6)	14 883 (28.6)	485 (0.9)	29 355 (132.3)
DEMI	LSA3 et LSA1	30 036 (46.8)	17 221 (27.4)	4 178 (7.3)	52 301 (81.2)	689 (1.1)	167 277 (113.3)
KARLIEN	LSA3 et SALSA	30 025 (36.4)	10 039 (12.8)	18 365 (23.1)	31 312 (38.0)	575 (0.7)	96 212 (82.3)
IRIS	LSA3 et STARP	53 312 (62.6)	25 223 (34.8)	6 458 (9.7)	35 078 (47.5)	799 (0.9)	196 223 (62.3)
<u>Animaux non</u>							
<u>immunisés</u>							
COR	β-GAL	1 399 (0.6)	2 599 (1.0)	3 625 (1.3)	786 (0.3)	2 600 (1.1)	19 395 (22.3)
PEER	β-GAL	1 225 (0.2)	1 369 (0.3)	3 251 (1.2)	2 960 (0.9)	3 962 (1.5)	59 399 (22.3)
BRAM	GST	1 201 (0.4)	509 (0.2)	2 501 (0.7)	2 659 (0.6)	2 745 (0.7)	39 399 (22.3)
FOUAD	PBS	1 211 (1.2)	1 310 (1.3)	956 (0.9)	688 (0.6)	655 (0.5)	136 258 (82.3)

a) Peptide de contrôle à partir de l'antigène MSP3 dans le sang

b) PPD = Dérivé de protéine purifié à partir de *Mycobacterium tuberculosis*.

tableau IV : INCORPORATION DE THYMIDINE TRITIEE DANS DES PBMC APRES STIMULATION IN VITRO AVEC DES SPOROZOITES.

			P. faiciparum sporozoïtes	P. yoellii sporozoïtes	P. berghei sporozoïtes
Chimpanzé	Antigène				
<u>animaux immunisés</u>					
DIRK	LSA3 et LSA1		10 402 (12.1)	5 552 (5.6)	2 110 (2.0)
GERDA	LSA3		24 021 (20.5)	18 228 (18.6)	2 430 (0.7)
DEMI	LSA3 et LSA1		2 111 (3.2)	935 (1.4)	214 (0.1)
KARLIEN	LSA3 et SALSA		4 402 (6.5)	2 228 (3.6)	914 (2.1)
IRIS	LSA3 et STARP		9 816 (14.2)	5 304 (8.1)	614 (2.0)
<u>animaux témoins</u>					
BRAM	GST		245 (0.4)	1 295 (1.6)	514 (1.2)
FOUAD	PBS		997 (1.5)	828 (1.6)	714 (1.1)

Les réponses lymphoprolifératives sont indiquées en différence de comptage en coups par minute (Δ CPM) entre le nombre de coups obtenus en présence d'antigène diminué du nombre de coups en l'absence d'antigène. Les chiffres entre parenthèses indiquent les indices de stimulation, c'est-à-dire le rapport du nombre de coups obtenus en présence d'antigènes sur le nombre de coups obtenus en l'absence d'antigènes.

Les résultats sont considérés comme positifs quand le Δ CPM est supérieur à 1000 et quand l'indice de stimulation est supérieur à 3.

10 4.4. Comparaison des réponses en anticorps de chimpanzés Nuria avant et après immunisation par différents peptides.

La figure 5 représente les quantités d'immunoglobulines présentes dans le sérum des chimpanzés Nuria avant et après immunisation par les peptides 729NR1 et 729RE, et les lipopeptides 729NR2, et CT1.

15 Cette expérience montre la supériorité quant à l'immunité B de l'antigène R, surtout quand il est conjugué à un résidu lipidique.

La figure 6 montre que le niveau d'anticorps spécifiques mesuré par Elisa contre le peptide 729NR2 dans des souris immunisées avec soit le peptide 729 NRII soit le lipopeptide 729NRII est nettement supérieur
20 quand le lipopeptide est utilisé quelle que soit l'espèce de souris.

Exemple 5 : Lymphoprolifération des PBMC d'un individu protégé par injection de sporozoïtes irradiés contre des peptides issus des antigènes LSA-1 et LSA-3.

Chez huit volontaires humains immunisés par injection de sporozoïtes irradiés, des anticorps anti-LSA-3 sont trouvés chez chacun
25 des quatre individus résistants à une infection par sporozoïtes ; aucun chez les quatre autres volontaires ayant développé une infection sanguine.

De plus, pour le seul de ces quatre individus protégés dont les cellules étaient accessibles, les PBMC ont été prélevées six mois après
30 l'infection d'épreuve et incubées en présence des peptides issus des antigènes LSA-1 et LSA-3.

La figure 10 représente les résultats des lymphoproliférations des PBMC d'un individu protégé par injection des sporozoïtes irradiés contre des peptides issus des antigènes LSA-1 et LSA-3.

Des lymphoproliférations importantes ont été observées avec chacun des trois peptides LSA-3 (NR1, NR2 et RE) mais avec aucun des peptides LSA-1. Il existait un niveau particulièrement élevé de sécrétion d'IFN- γ (100 UI/ml) après stimulation par le peptide NR1 et, à un moindre degré, par le peptide NR2 (IFN- γ : la cytokine ayant le plus fort effet bloquant sur la schizogonie hépatique).

10 Exemple 6 : Effets des anticorps contre les peptides de LSA-3 sur l'inhibition de la pénétration des sporozoïtes chez la souris.

Les techniques utilisées pour préparer les cultures primaires d'hépatocytes, les sporozoïtes, les anticorps et le test de fluorescence indirecte sont décrites en détail par S.MELLOUK et al, Bulletin of the
15 World Health Organization, 68 : 52-59, 1990. Le tableau V ci-dessous compare les résultats obtenus en immuno fluorescence soit par des anticorps contre le fragment 679 soit par des anticorps obtenus contre des fragments en provenance d'autres peptides. La colonne de gauche indique le nombre de schizontes détectés après 48h de culture dans des
20 hépatocytes de souris Balb c infectées par P.yoelii et la colonne de droite les mêmes paramètres après infection par P.Berghei.

Tableau V :

Clones d'anticorps	P.yoelii			P.berghei		
	IFA	Nbre de LS à 48 h		IFA	Nbre de LS à 48 h	
Contrôle		a)	b)			
679	++	88	110	-	119	108
	++		0	-		47
	++		0	-		ND
679	++	1		-	105	
679b	++	1		-	133	
679c	++	1		-	30	
32	++	8		±	103	
222	+		5	±		26
667	++	276	143	ND	502	
362	+	3				
493	++	55		ND	508	
α P.b. CSP Mab			82	+++		30
α P.y. CSP Mab	+++		171		138	

Il apparaît clairement que l'anticorps contre le peptide 679 a un effet d'inhibition quasi total du nombre de ce qu'ils ont observés à 48h dans les
5 cellules hépatiques. De la même façon La figure 7 montre l'inhibition de l'invasion des cellules hépatiques par les sporozoïtes par des sérums hyper humains obtenus après immunisation par différents peptides et immuno purifiés contre du LSA-3 entier.

En ce qui concerne les protections de souris, les meilleurs résultats
10 ont été obtenus par immunisation avec les recombinants, ou antigènes préparés selon l'invention, adsorbés sur des microsphères de latex ou de polystyrène de 0,5µm de diamètre :

- 3/3 souris sont protégées contre une administration par 10 fois la dose minimale infectieuse
- 15 - 3/3 souris sont protégées contre le second challenge
- 2/3 souris sont protégées contre le troisième challenge.

Les microsphères utilisées sont les Polybead ® Polystyrène Microsphères (Polysciences, Inc.) de 0,50 µm de diamètre (réf.07307) sur lesquelles les recombinants ou les peptides sont adsorbés passivement. En pratique, chez la souris, pour 1 injection, 50µg d'antigènes sont mis en contact avec 50µl de microbilles ; la quantité exacte d'antigènes adsorbée n'est pas déterminée. Chez le chimpanzé, la même procédure est effectuée avec 200 µg d'antigènes et 200 µl de billes.

De plus, récemment, l'immunisation de souris par le recombinant GST-3PC (correspondant à la région 3' non-répétée de l'acide aminé n° 869 au codon stop en 3') a permis d'obtenir des sérums réagissant très fortement en immunofluorescence sur les sporozoïtes de Plasmodium falciparum. Ce résultat est la première démonstration de la présence d'un ou de plusieurs épitopes B dans cette région de la molécule.

Exemple 7 : test de cytotoxicité contre le peptide 729 NRII chez le chimpanzé Gerda.

Le chimpanzé Gerda a été immunisé par voie i.v. avec le lipopeptide 729NRII issu de l'antigène LSA-3. Le sang est prélevé 9 jours après la 4ème injection. Les PBMC ont été incubés in vitro avec 5µg/ml du peptide 729NRII (ajout de l'IL2 recombinante, 10 U/ml, au jour 3). Au jour 15, l'activité cytotoxique a été étudiée contre les blastes autologues générés par la PHA à 0,5µg/ml. Les blastes ont été préincubés la nuit avec 5 µg/ml du peptide 729NRII, et avec un peptide contrôle : le RESA, ou sans peptide. Les peptides ne sont pas ajoutés pendant le test (8 heures). Le nombre de cibles par puits est de 5000.

Les PBMC de Gerda incubées pendant la même période avec 5µg/ml d'un peptide contrôle ou le peptide 729NRI (issu du même antigène), n'engendrent pas la lyse des blastes autologues préincubés ou non avec les peptides ci-dessus.

La figure 8 indique les résultats obtenus pour un rapport E/C (effecteur sur cible) variant de 12 à 0,03. On voit que les cellules cibles pré-sensibilisées par le peptide 729NRII sont lysés en présence de cellules effectrices ce

qui indique une réponse immunitaire de type T cytotoxique spécifique de cet antigène.

Le lipopeptide NR11, injecté par voie IV, est capable, sans adjuvant, d'induire une réponse cytotoxique spécifique.

5 Exemple 8 : effet du peptide NR1 sur la production d'interféron γ .

Il a été montré que les interférons avaient une activité inhibitrice dans le développement du P.falciparum dans les hépatocytes humains en culture (Sylvie Mellouk et al, The Journal of Immunology, vol 139 n° 12 : 41-92, 41-95, 1987). Les résultats obtenus avec les peptides de l'invention

10 sont les suivants :

Le chimpanzé Gerda, immunisé par la polypeptide NR 2 et boosté par le recombinant DG729, porte des PBMC capables de sécréter des taux élevés d'IFN- γ en présence des peptides LSA-3, en particulier le peptide 729 NR1. Le résultat a été confirmé chez le chimpanzé Dirk, immunisé par

15 la même protéine. Le chimpanzé BRAM, contrôle non immunisé, ne montre aucune interféronémie contre les peptides LSA-3.

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GTGATGAACT TTTTAATGAA TTATTAAA

28

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 29 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

TGTTGTICTT GTTGAACACT TTTTACTAA

29

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GGTATCGAAA CTGAGGAAAT AAAGG

25

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CATAGCAGGA ACATCAACAT CCAC

REVENDEICATIONS

1. Molécules polypeptidiques contenant au moins 10 amino acides consécutifs de la séquence d'acides aminés montrée dans la figure 2, les polypeptides suivants étant exclus :

-RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHNV
-VEESVEENDEESVEENVEENVENNDDGSVASSVEESIASSVDESIDSSIE -
ENVAPTVEEIVAPTVEEIVAPSVVEKCAPSVVEESVAPSVVEESVAEMLKER
(729S)

- 10 - RDELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQVNDDIFNSLVKSVQQEQQHN
- DELFNELLNSVDVNGEVKENILEESQ (NR I),
- LEESQVNDDIFSNSLVKSVQQEQQHNV (NR II),
- VESVAPSVVEESVAPSVVEESVAENVEESV. (729 RE)

2. Molécules selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins 20 amino acides consécutifs de ladite séquence.

3. Molécules selon la revendication 2 caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins 50 amino acides consécutifs de la ladite séquence.

4. Molécule polypeptide présentant au moins 70% d'homologie avec l'une des molécules de l'une quelconque des revendications 1 à 3.

- 20 5. Molécule polypeptidique caractérisée en ce qu'elle présente au moins 70% d'homologie avec la séquence suivante :

Leu Leu Ser Asn Ile Glu Glu Pro Lys Glu Asn Ile Ile Asp Asn Leu Leu Asn
Asn Ile (CT1)

6. Molécule polypeptidique selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce qu'elle présente au moins 70% d'homologie avec la séquence représentée dans la figure 3.

7. Composition immunogène caractérisée en ce qu'elle contient au moins une molécule polypeptidique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et au moins un véhicule pharmaceutique.

8. Composition de vaccin anti-palustre, contenant entre autres principes immunogènes, une molécule polypeptidique conforme à l'une des revendications 1 à 6.

9. Composition de vaccin selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle contient en outre, une molécule contenant au moins un épitope et issue du groupe constitué des molécules LSA-1, SALSA ou STARP.

10. Composition selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'elle contient au moins deux immunogènes, le premier étant choisi parmi les polypeptides suivants :

- 10 - celui de la figure 2,
- NRI,
- NRII,

et le deuxième étant choisi dans le groupe constitué de SALSA, SALSA I et SALSA II.

15 11. Anticorps polyclonaux ou monoclonaux, reconnaissant spécifiquement les molécules polypeptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

12. Méthode de diagnostic in vitro du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P.falciparum qui comprend la mise en contact
20 d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu, avec une molécule selon l'une des revendications 1 à 8 dans des conditions permettant une réaction immunologique, ladite molécule polypeptidique et les anticorps éventuellement présents dans le tissu ou le fluide biologique, et la détection in vitro des complexes du gène anticorps éventuellement
25 formé.

13. Méthode selon la revendication 12 caractérisée en ce que le tissu ou le fluide biologique sont mis en contact avec un mélange de molécules polypeptidiques répondant à l'une des revendications 1 à 6 et d'autres molécules issues d'antigènes du stade sporozoïte que sont LSA-1, SALSA
30 ou STARP.

14. Méthode de diagnostic *in vitro* du paludisme chez un individu susceptible d'être infecté par P.falciparum, caractérisée en ce qu' elle comprend la mise en contact d'un tissu ou d'un fluide biologique prélevé chez un individu, avec des anticorps selon la revendication 11, dans des conditions permettant une réaction immunologique in vitro entre lesdits anticorps et les protéines spécifiques de P.falciparum éventuellement présentes dans le tissu biologique, et la détection in vitro des complexes antigènes anticorps éventuellement formés.

15. Kit pour le diagnostic in vitro du paludisme selon la revendication 12 ou 13 caractérisé en ce qu'il comprend au moins une ou plusieurs molécules selon l'une des revendications 1 à 6, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction, les réactifs permettant la détection des complexes antigènes/anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où la molécule polypeptidique susmentionnée n'est pas marquée.

16. Kit pour le diagnostic in vitro du paludisme caractérisé en ce qu'il comprend :

- des anticorps selon la revendication 11,
- les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique,
- les réactifs permettant la détection des complexes antigènes/anticorps produits par la réaction immunologique, ces réactifs pouvant également porter un marqueur ou être susceptibles d'être reconnus à leur tour par un réactif marqué, plus particulièrement dans le cas où les anticorps susmentionnés ne sont pas marqués.

17. Utilisation d'une molécule polypeptidique selon l'une des revendications 1 à 6 dans la préparation d'un vaccin anti-palustre.

18. Utilisation d'un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 11 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du paludisme.

19. Composition pharmaceutique comportant à titre de substance active un ou plusieurs anticorps polyclonaux ou monoclonaux selon la revendication 11 en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable.

20. Séquence d'acides nucléiques caractérisée par l'une des séquences suivantes :

- 10 (a) l'enchaînement de nucléotides tel que représenté dans SEQ ID n° 1 de la figure 1, ou
- (b) l'enchaînement de nucléotides représenté dans SEQ ID n° 2 de la figure 2,
- (c) un enchaînement présentant au moins 70% d'homologie avec celui de la figure 1, ou de la figure 2 ou,
- 15 (d) un enchaînement de nucléotides complémentaires à ceux présentés en (a), (b) ou (c).

21. Acide nucléique selon la revendication 20 contenant une séquence codant pour une molécule polypeptidique selon l'une des revendications 1 à 6.

22. Vecteur recombinant pour le clonage d'une séquence nucléotidique selon la revendication 20 ou 21 et où l'expression d'un polypeptide codé par la susdite séquence contenant ladite séquence dans l'un des sites non essentiels pour sa réplication, ledit vecteur étant
25 notamment de type plasmide, cosmide ou phage.

23. Vecteur selon la revendication 22 caractérisé en ce qu'il est un plasmide déposé à la CNCM sous le n°I-1573 et référencé pK1.2.

24. Conjugués constitués de molécules polypeptidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 et d'un support sur lequel lesdites
30 molécules sont adsorbées.

25. Conjugués selon la revendication 24 caractérisés en ce que le support est constitué de microsphères ou billes de latex ou de polystyrène.

26. Utilisation d'un conjugué selon l'une des revendications 24 ou 25 à l'immunisation d'individus infectés ou susceptibles d'être infectés par le
5 paludisme.

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 6152 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATTTATTTAT TTTTATTGTT TTATTTCTTT TTTTCTTTA AATTGTATAT TTATAAATAT	60
TTTAAAAAGT TAGAAAATGA CAAATAGTAA TTACAAATCA AATAATAAAA CATATAATGA	120
AAATAATAAT GAACAAATAA CTACCATATT TAATAGAACA AATATGAATC CGATAAAAAA	180
ATGTCATATG AGAGAAAAAA TAAATAAGTA CTTTTTTTTG ATCAAATTT TGACATGCAC	240
CATTTTAATA TGGGCTGTAC AATATGATAA TAACGTAAGA TAAAAAACTA AATAATAAAT	300
ATAAATAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA ATCAACTATA TAGTATGTAT AATATATATA	360
TATATATATA TATATATATA TATATATATA TATTTATTTT TATTTATTTA TTAATTTTTT	420
TTTTTTTATA TTATCTTTTT AGTCTGATAT AAACAAGAGT TGGAAAAAAA ATACGTATGT	480
AGATAAGAAA TTGAATAAAC TATTTAACAG AAGTTTAGGA GAATCTCAAG TAAATGGTGA	540
ATTAGCTAGT GAAGAAGTAA AGGAAAAAAT TCTTGACTTA TTAGAAGAAG GAAATACATT	600
AACTGAAAGT GTAGATGATA ATAAAAATTT AGAAGAAGCC GAAGATATAA AGGAAAATAT	660
CTTATTAAGT AATATAGAAG AACCAAAAGA AAATATTATT GACAATTTAT TAAATAATAT	720
TGGACAAAAT TCAGAAAAAC AAGAAAGTGT ATCAGAAAAT GTACAACTCA GTGATGAACT	780
TTTTAATGAA TTATTAAATA GTGTAGATGT TAATGGAGAA GTAAAAGAAA ATATTTTGGA	840
GGAAAGTCAA GTTAATGACG ATATTTTAA TAGTTTAGTA AAAAGTGTTT AACAAGAACA	900
ACAACACAAT GTTGAAGAAA AAGTTGAAGA AAGTGTAGAA GAAAATGACG AAGAAAGTGT	960
AGAAGAAAAT GTAGAAGAAA ATGTAGAAGA AAATGACGAC GGAAGTGTAG CCTCAAGTGT	1020
TGAAGAAAGT ATAGCTTCAA GTGTTGATGA AAGTATAGAT TCAAGTATTG AAGAAAATGT	1080
AGCTCCAAGT GTTGAAGAAA TCGTAGCTCC AAGTGTGTA GAAAGTGTG CTCCAAGTGT	1140

FIGURE 1/A

2/26

TGAAGAAAGT	GTAGAAGAAA	ATGTTGAAGA	AAGTGTAGCT	GAAAATGTTG	AAGAAAGTGT	1200
AGCTGAAAAT	GTTGAAGAAA	GTGTAGCTGA	AAATGTTGAA	GAAAGTGTAG	CTGAAAATGT	1260
TGAAGAAATC	GTAGCTCCAA	CTGTTGAAGA	AATCGTAGCT	CCAAGTGTG	AAGAAATTGT	1320
AGCTCCAAGT	GTTGTAGAAA	GTGTGGCTCC	AAGTGTGAA	GAAAGTGTAG	AAGAAAATGT	1380
TGAAGAAAGT	GTAGCTGAAA	ATGTTGAAGA	AAGTGTAGCT	GAAAATGTTG	AAGAAAGTGT	1440
AGCTGAAAAT	GTTGAAGAAA	GTGTAGCTGA	AAATGTTGAA	GAAAGTGTAG	CTGAAAATGT	1500
TGAAGAAATC	GTAGCTCCAA	CTGTTGAAGA	AATCGTAGCT	CCAAGTGTG	AAGAAATTGT	1560
AGCTCCAAGT	GTTGTAGAAA	GTGTGGCTCC	AAGTGTGAA	GAAAGTGTAG	AAGAAAATGT	1620
TGAAGAAAGT	GTAGCTGAAA	ATGTTGAAGA	AAGTGTAGCT	GAAAATGTTG	AAGAAAGTGT	1680
AGCTGAAAAT	GTTGAAGAAA	GTGTAGCTGA	AAATGTTGAA	GAAAGTGTAG	CTGAAAATGT	1740
TGAAGAAAGT	GTAGCTGAAA	ATGTTGAAGA	AAGTGTAGCT	GAAAATGTTG	AAGAAATCGT	1800
AGCTCCAAGT	GTTGAAGAAA	TCGTAGCTCC	AACTGTTGAA	GAAATTGTAG	CTCCAAGTGT	1860
TGTAGAAAGT	GTGGCTCCAA	GTGTTGAAGA	AAGTGTAGAA	GAAAATGTTG	AAGAAAGTGT	1920
AGCTGAAAAT	GTTGAAGAAA	GTGTAGCTGA	AAATGTTGAA	GAAAGTGTAG	CTGAAAATGT	1980
TGAAGAAAGT	GTAGCTGAAA	ATGTTGAAGA	AATCGTAGCT	CCAAGTGTG	AAGAAATCGT	2040
AGCTCCAAGT	GTTGAAGAAA	TTGTAGCTCC	AAGTGTGTA	GAAAGTGTGG	CTCCAAGTGT	2100
TGAAGAAAGT	GTAGAAGAAA	ATGTTGAAGA	AAGTGTAGCT	GAAAATGTTG	AAGAAAGTGT	2160
AGCTGAAAAT	GTTGAAGAAA	GTGTAGCTGA	AAATGTTGAA	GAAATCGTAG	CTCCAAGTGT	2220
TGAAGAAATC	GTAGCTCCAA	CTGTTGAAGA	AATTGTAGCT	CCAAGTGTG	TAGAAAGTGT	2280
GGCTCCAAGT	GTTGAAGAAA	GTGTAGAAGA	AAATGTTGAA	GAAAGTGTAG	CTGAAAATGT	2340
TGAAGAAAGT	GTAGCTGAAA	ATGTTGAAGA	AAGTGTAGCT	GAAAATGTTG	AAGAAAGTGT	2400
AGCTGAAAAT	GTTGAAGAAA	TCGTAGCTCC	AACTGTTGAA	GAAATCGTAG	CTCCAAGTGT	2460
TGAAGAAATT	GTAGCTCCAA	GTGTTGTAGA	AAGTGTGGCT	CCAAGTGTG	AAGAAAGTGT	2520
AGAAGAAAAT	GTTGAAGAAA	GTGTAGCTGA	AAATGTTGAA	GAAAGTGTAG	CTGAAAATGT	2580
TGAAGAAAGT	GTAGCTGAAA	ATGTTGAAGA	AAGTGTAGCT	CCAAGTGTG	AAGAAATTGT	2640
AGCTCCAAGT	GTTGAAGAAA	GTGTAGCTCC	AAGTGTGAA	GAAAGTGTG	CTGAAAACGT	2700
TGCAACAAAT	TTATCAGACA	ATCTTTTAAG	TAATTTATTA	GGTGGTATCG	AAACTGAGGA	2760

FIGURE 1/B

3/26

AATAAAGGAC AGTATATTAA ATGAGATAGA AGAAGTAAAA GAAAATGTAG TCACCACAAT	2820
ACTAGAAAAC GTAGAAGAAA CTACAGCTGA AAGTGTAAGT ACTTTTAGTA ACATATTAGA	2880
GGAGATACAA GAAAATACTA TTACTAATGA TACTATAGAG GAAAAATTAG AAGAACTCCA	2940
CGAAAATGTA TTAAGTGCCG CTTTAGAAAA TACCCAAAGT GAAGAGGAAA AGAAAGAAGT	3000
AATAGATGTA ATTGAAGAAG TAAAAGAAGA GGTGCTACC ACTTTAATAG AACTGTGGA	3060
ACAGGCAGAA GAAAAGAGCG CAAATACAAT TACGGAAATA TTTGAAAATT TAGAAGAAAA	3120
TGCAGTAGAA AGTAATGAAA ATGTTGCAGA GAATTTAGAG AAATTAAACG AACTGTATT	3180
TAATACTGTA TTAGATAAAG TAGAGGAAAC AGTAGAAATT AGCGGAGAAA GTTAGAAAA	3240
CAATGAAATG GATAAAGCAT TTTTACTGA AATATTTGAT AATGTAAAAG GAATACAAGA	3300
AAATTTATTA ACAGGTATGT TTCGAAGTAT AGAAACCACT ATAGTAATCC AATCAGAAGA	3360
AAAGGTTGAT TTGAATGAAA ATGTGGTTAG TTCGATTTTA GATAATATAG AAAATATGAA	3420
AGAAGGTTTA TTAAATAAAT TAGAAAATAT TTCAAGTACT GAAGGTGTTT AAGAACTGT	3480
AACTGAACAT GTAGAACAAA ATGTATATGT GGATGTTGAT GTTCCTGCTA TGAAAGATCA	3540
ATTTTITAGGA ATATTAAATG AGGCAGGAGG GTTGAAAGAA ATGTTTTTTTA ATTTGGAAGA	3600
TGTATTTAAA AGTGAAAGTG ATGTAATTAC TGTAGAAGAA ATTAAGGATG AACCGGTTCA	3660
AAAAGAGGTA GAAAAAGAAA CTGTTAGTAT TATTGAAGAA ATGCAAGAAA ATATTGTAGA	3720
TGTATTAGAG GAAGAAAAAG AAGATTTAAC AGACAAGATG ATAGATGCAG TAGAAGAATC	3780
CATAGAAATA TCTTCAGATT CTAAAGAAGA AACTGAATCT ATTAAAGATA AAGAAAAAGA	3840
TGTTTCACTA GTTGTGAAG AAGTTCAAGA CAATGATATG GATGAAAGTG TTGAGAAAGT	3900
TTTAGAATTG AAAAATATGG AAGAGGAGTT AATGAAGGAT GCTGTTGAAA TAAATGACAT	3960
TACTAGCAAA CTTATTGAAG AACTCAAGA GTTAAATGAA GTAGAAGCAG ATTTAATAAA	4020
AGATATGGAA AAATTAAAAG AATTAGAAAA AGCATTATCA GAAGATTCTA AAGAAATAAT	4080
AGATGCAAAA GATGATACAT TAGAAAAAGT TATTGAAGAG GAACATGATA TAACGACGAC	4140
GTTGGATGAA GTTGTAGAAT TAAAAGATGT CGAAGAAGAC AAGATCGAAA AAGTATCTGA	4200
TTTAAAAGAT CTTGAAGAAG ATATATTAAA AGAAGTAAAA GAAATCAAAG AACTTCAAAG	4260
TGAAATTTTA GAAGATTATA AAGAATTAAA AACTATTGAA ACAGATATTT TAGAAGAGAA	4320
AAAAGAAATA GAAAAAGATC ATTTTAAAA ATTCAAGAA GAAGCTGAAG AAATAAAGA	4380

FIGURE 1/C

4/26

TCTTGAAGCA GATATATTAA AAGAAGTATC TTCATTAGAA GTTGAAGAAG AAAAAAAATT	4440
AGAAGAAGTA CACGAATTAA AAGAAGAGGT AGAACATATA ATAAGTGGTG ATGCCGATAT	4500
AAAAGGTTTG GAAGAAGATG ATTTAGAAGA AGTAGATGAT TTAAAAGGAA GTATATTAGA	4560
CATGTTAAAG GGAGATATGG AATTAGGGGA TATGGATAAG GAAAGTTTAG AAGATGTAAC	4620
AACAAAACCTT GGAGAAAGAG TTGAATCCTT AAAAGATGTT TTATCTAGTG CATTAGGCAT	4680
GGATGAAGAA CAAATGAAAA CAAGAAAAAA AGCTCAAAGA CCTAAGTTGG AAGAAGTATT	4740
ATTTAAAGAA GAGGTTAAAG AAGAACCAAA GAAAAAATA ACAAAAAAGA AAGTAAGGTT	4800
TGATATTAAAG GATAAGGAAC CAAAAGATGA AATAGTAGAA GTTGAAATGA AAGATGAAGA	4860
TATAGAAGAA GATGTAGAAG AAGATATAGA AGAAGATATA GAAGAAGATA AAGTTGAAGA	4920
TATAGATGAA GATATAGATG AAGATATAGG TGAAGACAAA GATGAAGTTA TAGATTTAAT	4980
AGTCCAAAAA GAGAAACGCA TTGAAAAGGT TAAAGCGAAA AAGAAAAAAT TAGAAAAAAA	5040
AGTTGAAGAA GGTGTTAGTG GTCTTAAAAA ACACGTAGAC GAAGTAATGA AATATGTTCA	5100
AAAAATTGAT AAAGAAGTTG ATAAAGAAGT ATCTAAAGCT TTAGAATCAA AAAATGATGT	5160
TACTAATGTT TTAAAACAAA ATCAAGATTT TTTTAGTAAA GTTAAAAACT TCGTAAAAAA	5220
ATATAAAGTA TTTGCTGCAC CATTATATC TGCCGTTGCA GCATTTCAT CATATGTAGT	5280
TGGGTTCTTT ACATTTTCTT TATTTTCATC ATGTGTAACA ATAGCTTCTT CAACTTACTT	5340
ATTATCAAAA GTTGACAAAA CTATAATAA AAATAAGGAG AGACCGTTTT ATTCATTGT	5400
ATTGATATC TTTAAGAATT TAAACATTA TTTACAACAA ATGAAAGAAA AATTTAGTAA	5460
AGAAAAAAT AATAATGTAA TAGAAGTAAC AAACAAAGCT GAGAAAAAAG GTAATGTACA	5520
GGTAACAAAT AAAACCGAGA AAACAACTAA AGTTGATAAA AATAATAAAG TACCGAAAAA	5580
AAGAAGAAG CAAAAATCAA AATAAAAAAT TGCAGAAGAG TGAAATGATT GGAGCGAACA	5640
ATAAAATTAA TCGATAAAAA ATATAAAAT GTATATATTA TGTAAATATA TATAAATAAA	5700
TAAATAAATA CATACATATA TATATATATA TATATGTATC TTTTACAAA ATTTTAAAT	5760
TTTAAATTT ATATATATTA ATATTTATAT TTTTCATAT ATAATTTTAT TTTCAATATT	5820
TTATTTTAA TTATAAATGT TTTTACAGA GTTTATGTTT TTAATTAAT ATATAGATTT	5880
CTGTAAGAAA CTGTATATTA TTCATACGAT ATATGTAATA TTAATTATTT GTGTTTTATT	5940
AAAATTTATA TTATATAATA TATATATATA TATATATGTA TATATATTAG AAGATAAAAA	6000

FIGURE 1/D

5/26

TTTAGCTTAT TTTGCTTGTT ATGCAAATAA GCTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTC	6060
ATATAAACGA TGTTTAATTT TTAATTTTTA ATATTTTATA TAAAATATTT TTCCTAAAAA	6120
AAAAAAAAAT TAAAAAAAAAC TTATATTTTCG AA	6152

6/26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 5361 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 1..5361

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATG ACA AAT AGT AAT TAC AAA TCA AAT AAT AAA ACA TAT AAT GAA AAT	48
Met Thr Asn Ser Asn Tyr Lys Ser Asn Asn Lys Thr Tyr Asn Glu Asn	
1 5 10 15	
AAT AAT GAA CAA ATA ACT ACC ATA TTT AAT AGA ACA AAT ATG AAT CCG	96
Asn Asn Glu Gln Ile Thr Thr Ile Phe Asn Arg Thr Asn Met. Asn Pro	
20 25 30	
ATA AAA AAA TGT CAT ATG AGA GAA AAA ATA AAT AAG TAC TTT TTT TTG	144
Ile Lys Lys Cys His Met Arg Glu Lys Ile Asn Lys Tyr Phe Phe Leu	
35 40 45	
ATC AAA ATT TTG ACA TGC ACC ATT TTA ATA TGG GCT GTA CAA TAT GAT	192
Ile Lys Ile Leu Thr Cys Thr Ile Leu Ile Trp Ala Val Gln Tyr Asp	
50 55 60	
AAT AAC TCT GAT ATA AAC AAG AGT TGG AAA AAA AAT ACG TAT GTA GAT	240
Asn Asn Ser Asp Ile Asn Lys Ser Trp Lys Lys Asn Thr Tyr Val Asp	
65 70 75 80	
AAG AAA TTG AAT AAA CTA TTT AAC AGA AGT TTA GGA GAA TCT CAA GTA	288
Lys Lys Leu Asn Lys Leu Phe Asn Arg Ser Leu Gly Glu Ser Gln Val	
85 90 95	
AAT GGT GAA TTA GCT AGT GAA GAA GTA AAG GAA AAA ATT CTT GAC TTA	336
Asn Gly Glu Leu Ala Ser Glu Glu Val Lys Glu Lys Ile Leu Asp Leu	
100 105 110	
TTA GAA GAA GGA AAT ACA TTA ACT GAA AGT GTA GAT GAT AAT AAA AAT	384
Leu Glu Glu Gly Asn Thr Leu Thr Glu Ser Val Asp Asp Asn Lys Asn	
115 120 125	

FIGURE 2/A

7/26

TTA GAA GAA GCC GAA GAT ATA AAG GAA AAT ATC TTA TTA AGT AAT ATA Leu Glu Glu Ala Glu Asp Ile Lys Glu Asn Ile Leu Leu S r Asn Ile 130 135 140	432
GAA GAA CCA AAA GAA AAT ATT ATT GAC AAT TTA TTA AAT AAT ATT GGA Glu Glu Pro Lys Glu Asn Ile Ile Asp Asn Leu Leu Asn Asn Ile Gly 145 150 155 160	480
CAA AAT TCA GAA AAA CAA GAA AGT GTA TCA GAA AAT GTA CAA GTC AGT Gln Asn Ser Glu Lys Gln Glu Ser Val Ser Glu Asn Val Gln Val Ser 165 170 175	528
GAT GAA CTT TTT AAT GAA TTA TTA AAT AGT GTA GAT GTT AAT GGA GAA Asp Glu Leu Phe Asn Glu Leu Leu Asn Ser Val Asp Val Asn Gly Glu 180 185 190	576
GTA AAA GAA AAT ATT TTG GAG GAA AGT CAA GTT AAT GAC GAT ATT TTT Val Lys Glu Asn Ile Leu Glu Glu Ser Gln Val Asn Asp Asp Ile Phe 195 200 205	624
AAT AGT TTA GTA AAA AGT GTT CAA CAA GAA CAA CAA CAC AAT GTT GAA Asn Ser Leu Val Lys Ser Val Gln Gln Glu Gln Gln His Asn Val Glu 210 215 220	672
GAA AAA GTT GAA GAA AGT GTA GAA GAA AAT GAC GAA GAA AGT GTA GAA Glu Lys Val Glu Glu Ser Val Glu Glu Asn Asp Glu Glu Ser Val Glu 225 230 235 240	720
GAA AAT GTA GAA GAA AAT GTA GAA GAA AAT GAC CAC GCA AGT GTA GCC Glu Asn Val Glu Glu Asn Val Glu Glu Asn Asp Asp Gly Ser Val Ala 245 250 255	768
TCA AGT GTT GAA GAA AGT ATA GCT TCA AGT GTT GAT GAA AGT ATA GAT Ser Ser Val Glu Glu Ser Ile Ala Ser Ser Val Asp Glu Ser Ile Asp 260 265 270	816
TCA AGT ATT GAA GAA AAT GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATC GTA GCT Ser Ser Ile Glu Glu Asn Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala 275 280 285	864
CCA AGT GTT GTA GAA AGT GTG GCT CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GAA Pro Ser Val Val Glu Ser Val Ala Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Glu 290 295 300	912
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 305 310 315 320	960
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 325 330 335	1008

FIGURE 2/B

8/26

GAA AAT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATC GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala 340 345 350	1056
CCA ACT GTT GAA GAA ATT GTA GCT CCA AGT GTT GTA GAA AGT GTG GCT Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Ser Val Val Glu Ser Val Ala 355 360 365	1104
CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GAA GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Glu Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 370 375 380	1152
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 385 390 395 400	1200
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 405 410 415	1248
GAA AAT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATC GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala 420 425 430	1296
CCA ACT GTT GAA GAA ATT GTA GCT CCA AGT GTT GTA GAA AGT GTG GCT Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Ser Val Val Glu Ser Val Ala 435 440 445	1344
CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GAA GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Glu Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 450 455 460	1392
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 465 470 475 480	1440
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 485 490 495	1488
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 500 505 510	1536
GAA AAT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATC GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala 515 520 525	1584
CCA ACT GTT GAA GAA ATT GTA GCT CCA AGT GTT GTA GAA AGT GTG GCT Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Ser Val Val Glu Ser Val Ala 530 535 540	1632

FIGURE 2/C

9/26

CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GAA GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Glu Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 545 550 555 560	1680
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 565 570 575	1728
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA ATC GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ile Val Ala 580 585 590	1776
CCA ACT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATT GTA GCT Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala 595 600 605	1824
CCA AGT GTT GTA GAA AGT GTG GCT CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GAA Pro Ser Val Val Glu Ser Val Ala Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Glu 610 615 620	1872
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 625 630 635 640	1920
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA ATC GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ile Val Ala 645 650 655	1968
CCA ACT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATT GTA GCT Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala 660 665 670	2016
CCA AGT GTT GTA GAA AGT GTG GCT CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GAA Pro Ser Val Val Glu Ser Val Ala Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Glu 675 680 685	2064
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 690 695 700	2112
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 705 710 715 720	2160
GAA AAT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATC GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala 725 730 735	2208
CCA ACT GTT GAA GAA ATT GTA GCT CCA ACT GTT GTA GAA AGT GTG GCT Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Ser Val Val Glu Ser Val Ala 740 745 750	2256

FIGURE 2/D

10/26

CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GAA GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Pr Ser Val Glu Glu Ser Val Glu Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 755 760 765	2304
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala 770 775 780	2352
GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATT GTA GCT Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala 785 790 795 800	2400
CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GCT CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTT GCT Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Ala Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Ala 805 810 815	2448
GAA AAC GTT GCA ACA AAT TTA TCA GAC AAT CTT TTA AGT AAT TTA TTA Glu Asn Val Ala Thr Asn Leu Ser Asp Asn Leu Leu Ser Asn Leu Leu 820 825 830	2496
GGT GGT ATC GAA ACT GAG GAA ATA AAG GAC AGT ATA TTA AAT GAG ATA Gly Gly Ile Glu Thr Glu Glu Ile Lys Asp Ser Ile Leu Asn Glu Ile 835 840 845	2544
GAA GAA GTA AAA GAA AAT GTA GTC ACC ACA ATA CTA GAA AAC GTA GAA Glu Glu Val Lys Glu Asn Val Val Thr Thr Ile Leu Glu Asn Val Glu 850 855 860	2592
GAA ACT ACA GCT GAA AGT GTA ACT ACT TTT AGT AAC ATA TTA GAG GAG Glu Thr Thr Ala Glu Ser Val Thr Thr Phe Ser Asn Ile Leu Glu Glu 865 870 875 880	2640
ATA CAA GAA AAT ACT ATT ACT AAT GAT ACT ATA GAG GAA AAA TTA GAA Ile Gln Glu Asn Thr Ile Thr Asn Asp Thr Ile Glu Glu Lys Leu Glu 885 890 895	2688
GAA CTC CAC GAA AAT GTA TTA AGT GCC GCT TTA GAA AAT ACC CAA AGT Glu Leu His Glu Asn Val Leu Ser Ala Ala Leu Glu Asn Thr Gln Ser 900 905 910	2736
GAA GAG GAA AAG AAA GAA GTA ATA GAT GTA ATT GAA GAA GTA AAA GAA Glu Glu Glu Lys Lys Glu Val Ile Asp Val Ile Glu Glu Val Lys Glu 915 920 925	2784
GAG GTC GCT ACC ACT TTA ATA GAA ACT GTG GAA CAG GCA GAA GAA AAG Glu Val Ala Thr Thr Leu Ile Glu Thr Val Glu Gln Ala Glu Glu Lys 930 935 940	2832
AGC GCA AAT ACA ATT ACG GAA ATA TTT GAA AAT TTA GAA GAA AAT GCA Ser Ala Asn Thr Ile Thr Glu Ile Phe Glu Asn Leu Glu Glu Asn Ala 945 950 955 960	2880

FIGURE 2/E

11/26

GTA GAA AGT AAT GAA AAT GTT GCA GAG AAT TTA GAG AAA TTA AAC GAA Val Glu Ser Asn Glu Asn Val Ala Glu Asn Leu Glu Lys Leu Asn Glu 965 970 975	2928
ACT GTA TTT AAT ACT GTA TTA GAT AAA GTA GAG GAA ACA GTA GAA ATT Thr Val Phe Asn Thr Val Leu Asp Lys Val Glu Glu Thr Val Glu Ile 980 985 990	2976
AGC GGA GAA AGT TTA GAA AAC AAT GAA ATG GAT AAA GCA TTT TTT AGT Ser Gly Glu Ser Leu Glu Asn Asn Glu Met Asp Lys Ala Phe Phe Ser 995 1000 1005	3024
GAA ATA TTT GAT AAT GTA AAA GGA ATA CAA GAA AAT TTA TTA ACA GGT Glu Ile Phe Asp Asn Val Lys Gly Ile Gln Glu Asn Leu Leu Thr Gly 1010 1015 1020	3072
ATG TTT CGA AGT ATA GAA ACC AGT ATA GTA ATC CAA TCA GAA GAA AAG Met Phe Arg Ser Ile Glu Thr Ser Ile Val Ile Gln Ser Glu Glu Lys 1025 1030 1035 1040	3120
GTT GAT TTG AAT GAA AAT GTG GTT AGT TCG ATT TTA GAT AAT ATA GAA Val Asp Leu Asn Glu Asn Val Val Ser Ser Ile Leu Asp Asn Ile Glu 1045 1050 1055	3168
AAT ATG AAA GAA GGT TTA TTA AAT AAA TTA GAA AAT ATT TCA AGT ACT Asn Met Lys Glu Gly Leu Leu Asn Lys Leu Glu Asn Ile Ser Ser Thr 1060 1065 1070	3216
GAA GGT GTT CAA GAA ACT GTA ACT GAA CAT GTA GAA CAA AAT GTA TAT Glu Gly Val Gln Glu Thr Val Thr Glu His Val Glu Gln Asn Val Tyr 1075 1080 1085	3264
GTG GAT GTT GAT GTT CCT GCT ATG AAA GAT CAA TTT TTA GGA ATA TTA Val Asp Val Asp Val Pro Ala Met Lys Asp Gln Phe Leu Gly Ile Leu 1090 1095 1100	3312
AAT GAG GCA GGA GCG TTG AAA GAA ATG TTT TTT AAT TTG GAA GAT GTA Asn Glu Ala Gly Gly Leu Lys Glu Met Phe Phe Asn Leu Glu Asp Val 1105 1110 1115 1120	3360
TTT AAA AGT GAA AGT GAT GTA ATT ACT GTA GAA GAA ATT AAG GAT GAA Phe Lys Ser Glu Ser Asp Val Ile Thr Val Glu Glu Ile Lys Asp Glu 1125 1130 1135	3408
CCG GTT CAA AAA GAG GTA GAA AAA GAA ACT GTT AGT ATT ATT GAA GAA Pro Val Gln Lys Glu Val Glu Lys Glu Thr Val Ser Ile Ile Glu Glu 1140 1145 1150	3456
ATG GAA GAA AAT ATT GTA GAT GTA TTA GAG GAA GAA AAA GAA GAT TTA Met Glu Glu Asn Ile Val Asp Val Leu Glu Glu Glu Lys Glu Asp Leu 1155 1160 1165	3504

FIGURE 2/F

12/26

ACA GAC AAG ATG ATA GAT GCA GTA GAA GAA TCC ATA GAA ATA TCT TCA Thr Asp Lys Met Ile Asp Ala Val Glu Glu Ser Ile Glu Ile Ser Ser 1170 1175 1180	3552
GAT TCT AAA GAA GAA ACT GAA TCT ATT AAA GAT AAA GAA AAA GAT GTT Asp Ser Lys Glu Glu Thr Glu Ser Ile Lys Asp Lys Glu Lys Asp Val 1185 1190 1195 1200	3600
TCA CTA GTT GTT GAA GAA GTT CAA GAC AAT GAT ATG GAT GAA AGT GTT Ser Leu Val Val Glu Glu Val Gln Asp Asn Asp Met Asp Glu Ser Val 1205 1210 1215	3648
GAG AAA GTT TTA GAA TTG AAA AAT ATG GAA GAG GAG TTA ATG AAG GAT Glu Lys Val Leu Glu Leu Lys Asn Met Glu Glu Glu Leu Met Lys Asp 1220 1225 1230	3696
GCT GTT GAA ATA AAT GAC ATT ACT AGC AAA CTT ATT GAA GAA ACT CAA Ala Val Glu Ile Asn Asp Ile Thr Ser Lys Leu Ile Glu Glu Thr Gln 1235 1240 1245	3744
GAG TTA AAT GAA GTA GAA GCA GAT TTA ATA AAA GAT ATG GAA AAA TTA Glu Leu Asn Glu Val Glu Ala Asp Leu Ile Lys Asp Met Glu Lys Leu 1250 1255 1260	3792
AAA GAA TTA GAA AAA GCA TTA TCA GAA GAT TCT AAA GAA ATA ATA GAT Lys Glu Leu Glu Lys Ala Leu Ser Glu Asp Ser Lys Glu Ile Ile Asp 1265 1270 1275 1280	3840
GCA AAA GAT GAT ACA TTA GAA AAA GTT ATT GAA GAG GAA CAT GAT ATA Ala Lys Asp Asp Thr Leu Glu Lys Val Ile Glu Glu Glu His Asp Ile 1285 1290 1295	3888
ACG ACG ACG TTG GAT GAA GTT GTA GAA TTA AAA GAT GTC GAA GAA GAC Thr Thr Thr Leu Asp Glu Val Val Glu Leu Lys Asp Val Glu Glu Asp 1300 1305 1310	3936
AAG ATC GAA AAA GTA TCT GAT TTA AAA GAT CTT GAA GAA GAT ATA TTA Lys Ile Glu Lys Val Ser Asp Leu Lys Asp Leu Glu Glu Asp Ile Leu 1315 1320 1325	3984
AAA GAA GTA AAA GAA ATC AAA GAA CTT GAA AGT GAA ATT TTA GAA GAT Lys Glu Val Lys Glu Ile Lys Glu Leu Glu Ser Glu Ile Leu Glu Asp 1330 1335 1340	4032
TAT AAA GAA TTA AAA ACT ATT GAA ACA GAT ATT TTA GAA GAG AAA AAA Tyr Lys Glu Leu Lys Thr Ile Glu Thr Asp Ile Leu Glu Glu Lys Lys 1345 1350 1355 1360	4080
GAA ATA GAA AAA GAT CAT TTT GAA AAA TTC GAA GAA GAA GCT GAA GAA Glu Ile Glu Lys Asp His Phe Glu Lys Phe Glu Glu Glu Ala Glu Glu 1365 1370 1375	4128

FIGURE 2/G

13/26

ATA AAA GAT CTT GAA GCA GAT ATA TTA AAA GAA GTA TCT TCA TTA GAA Ile Lys Asp Leu Glu Ala Asp Ile Leu Lys Glu Val S r Ser Leu Glu 1380 1385 1390	4176
GTT GAA GAA GAA AAA AAA TTA GAA GAA GTA CAC GAA TTA AAA GAA GAG Val Glu Glu Glu Lys Lys Leu Glu Glu Val His Glu Leu Lys Glu Glu 1395 1400 1405	4224
GTA GAA CAT ATA ATA AGT GGT GAT GCG CAT ATA AAA GGT TTG GAA GAA Val Glu His Ile Ile Ser Gly Asp Ala His Ile Lys Gly Leu Glu Glu 1410 1415 1420	4272
GAT GAT TTA GAA GAA GTA GAT GAT TTA AAA GGA AGT ATA TTA GAC ATG Asp Asp Leu Glu Glu Val Asp Asp Leu Lys Gly Ser Ile Leu Asp Met 1425 1430 1435 1440	4320
TTA AAG GGA GAT ATG GAA TTA GGG GAT ATG GAT AAG GAA AGT TTA GAA Leu Lys Gly Asp Met Glu Leu Gly Asp Met Asp Lys Glu Ser Leu Glu 1445 1450 1455	4368
GAT GTA ACA ACA AAA CTT GGA GAA AGA GTT GAA TCC TTA AAA GAT GTT Asp Val Thr Thr Lys Leu Gly Glu Arg Val Glu Ser Leu Lys Asp Val 1460 1465 1470	4416
TTA TCT AGT GCA TTA GGC ATG GAT GAA GAA CAA ATG AAA ACA AGA AAA Leu Ser Ser Ala Leu Gly Met Asp Glu Glu Gln Met Lys Thr Arg Lys 1475 1480 1485	4464
AAA GCT CAA AGA CCT AAG TTG GAA GAA GTA TTA TTA AAA GAA GAG GTT Lys Ala Gln Arg Pro Lys Leu Glu Glu Val Leu Leu Lys Glu Glu Val 1490 1495 1500	4512
AAA GAA GAA CCA AAG AAA AAA ATA ACA AAA AAG AAA GTA ACG TTT GAT Lys Glu Glu Pro Lys Lys Lys Ile Thr Lys Lys Lys Val Arg Phe Asp 1505 1510 1515 1520	4560
ATT AAG GAT AAG GAA CCA AAA GAT GAA ATA GTA GAA GTT GAA ATG AAA Ile Lys Asp Lys Glu Pro Lys Asp Glu Ile Val Glu Val Glu Met Lys 1525 1530 1535	4608
GAT GAA GAT ATA GAA GAA GAT GTA GAA GAA GAT ATA GAA GAA GAT ATA Asp Glu Asp Ile Glu Glu Asp Val Glu Glu Asp Ile Glu Glu Asp Ile 1540 1545 1550	4656
GAA GAA GAT AAA GTT GAA GAT ATA GAT GAA GAT ATA GAT GAA GAT ATA Glu Glu Asp Lys Val Glu Asp Ile Asp Glu Asp Ile Asp Glu Asp Ile 1555 1560 1565	4704
GGT GAA GAC AAA GAT GAA GTT ATA GAT TTA ATA GTC CAA AAA GAG AAA Gly Glu Asp Lys Asp Glu Val Ile Asp Leu Ile Val Gln Lys Glu Lys 1570 1575 1580	4752

FIGURE 2/H

14/26

CGC ATT GAA AAG GTT AAA GCG AAA AAG AAA AAA TTA GAA AAA AAA GTT Arg Ile Glu Lys Val Lys Ala Lys Lys Lys Lys Leu Glu Lys Lys Val 1585 1590 1595 1600	4800
GAA GAA GGT GTT AGT GGT CTT AAA AAA CAC GTA GAC GAA GTA ATG AAA Glu Glu Gly Val Ser Gly Leu Lys Lys His Val Asp Glu Val Met Lys 1605 1610 1615	4848
TAT GTT CAA AAA ATT GAT AAA GAA GTT GAT AAA GAA GTA TCT AAA GCT Tyr Val Gln Lys Ile Asp Lys Glu Val Asp Lys Glu Val Ser Lys Ala 1620 1625 1630	4896
TTA GAA TCA AAA AAT GAT GTT ACT AAT GTT TTA AAA CAA AAT CAA GAT Leu Glu Ser Lys Asn Asp Val Thr Asn Val Leu Lys Gln Asn Gln Asp 1635 1640 1645	4944
TTT TTT AGT AAA GTT AAA AAC TTC GTA AAA AAA TAT AAA GTA TTT GCT Phe Phe Ser Lys Val Lys Asn Phe Val Lys Lys Tyr Lys Val Phe Ala 1650 1655 1660	4992
GCA CCA TTC ATA TCT GCC GTT GCA GCA TTT GCA TCA TAT GTA GTT GGG Ala Pro Phe Ile Ser Ala Val Ala Ala Phe Ala Ser Tyr Val Val Gly 1665 1670 1675 1680	5040
TTC TTT ACA TTT TCT TTA TTT TCA TCA TGT GTA ACA ATA GCT TCT TCA Phe Phe Thr Phe Ser Leu Phe Ser Ser Cys Val Thr Ile Ala Ser Ser 1685 1690 1695	5088
ACT TAC TTA TTA TCA AAA GTT GAC AAA ACT ATA AAT AAA AAT AAG GAG Thr Tyr Leu Leu Ser Lys Val Asp Lys Thr Ile Asn Lys Asn Lys Glu 1700 1705 1710	5136
AGA CCG TTT TAT TCA TTT GTA TTT GAT ATC TTT AAG AAT TTA AAA CAT Arg Pro Phe Tyr Ser Phe Val Phe Asp Ile Phe Lys Asn Leu Lys His 1715 1720 1725	5184
TAT TTA CAA CAA ATG AAA GAA AAA TTT AGT AAA GAA AAA AAT AAT AAT Tyr Leu Gln Gln Met Lys Glu Lys Phe Ser Lys Glu Lys Asn Asn Asn 1730 1735 1740	5232
GTA ATA GAA GTA ACA AAC AAA GCT GAG AAA AAA CGT AAT GTA CAG GTA Val Ile Glu Val Thr Asn Lys Ala Glu Lys Lys Gly Asn Val Gln Val 1745 1750 1755 1760	5280
ACA AAT AAA ACC GAG AAA ACA ACT AAA GTT GAT AAA AAT AAT AAA GTA Thr Asn Lys Thr Glu Lys Thr Thr Lys Val Asp Lys Asn Asn Lys Val 1765 1770 1775	5328
CCG AAA AAA AGA AGA ACG CAA AAA TCA AAA TAA Pro Lys Lys Arg Arg Thr Gln Lys Ser Lys * 1780 1785	5361

FIGURE 2/I

15/26

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1891 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 2..1891

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

T ACA TTA ACT GAA AGT GTA GAT GAT AAT AAA AAT TTA GAA GAA GCC	46
Thr Leu Thr Glu Ser Val Asp Asp Asn Lys Asn Leu Glu Glu Ala	
1 5 10 15	
GAA GAT ATA AAG GAA AAT ATC TTA TTA AGT AAT ATA GAA GAA CCA AAA	94
Glu Asp Ile Lys Glu Asn Ile Leu Leu Ser Asn Ile Glu Glu Pro Lys	
20 25 30	
GAA AAT ATT ATT GAC AAT TTA TTA AAT AAT ATT CGA CAA AAT TCA GAA	142
Glu Asn Ile Ile Asp Asn Leu Leu Asn Asn Ile Gly Gln Asn Ser Glu	
35 40 45	
AAA CAA GAA AGT GTA TCA GAA AAT GTA CAA GTC AGT GAT GAA CTT TTT	190
Lys Gln Glu Ser Val Ser Glu Asn Val Gln Val Ser Asp Glu Leu Phe	
50 55 60	
AAT GAA TTA TTA AAT AGT GTA GAT GTT AAT CGA GAA GTA AAA GAA AAT	238
Asn Glu Leu Leu Asn Ser Val Asp Val Asn Gly Glu Val Lys Glu Asn	
65 70 75	
ATT TTG GAG GAA AGT CAA GTT AAT GAC GAT ATT TTT AAT AGT TTA GTA	286
Ile Leu Glu Glu Ser Gln Val Asn Asp Asp Ile Phe Asn Ser Leu Val	
80 85 90 95	
AAA AGT GTT CAA CAA GAA CAA CAA CAC AAT GTT GAA GAA AAA GTT GAA	334
Lys Ser Val Gln Gln Glu Gln Gln His Asn Val Glu Glu Lys Val Glu	
100 105 110	
GAA ACT GTA GAA GAA AAT GAC GAA GAA AGT GTA GAA GAA AAT GTA GAA	382
Glu Ser Val Glu Glu Asn Asp Glu Glu Ser Val Glu Glu Asn Val Glu	
115 120 125	
GAA AAT GTA GAA GAA AAT GAC GAC GGA AGT GTA GCC TCA AGT GTT GAA	430
Glu Asn Val Glu Glu Asn Asp Asp Gly Ser Val Ala Ser Ser Val Glu	
130 135 140	

FIGURE 3/A

16/26

GAA AGT ATA GCT TCA AGT GTT GAT GAA AGT ATA GAT TCA AGT ATT GAA Glu Ser Ile Ala Ser Ser Val Asp Glu Ser Ile Asp Ser Ser Ile Glu 145 150 155	478
GAA AAT GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA ACT GTT GAA Glu Asn Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu 160 165 170 175	526
GAA ATT GTA GCT CCA AGT GTT GTA GAA AGT GTG GCT CCA AGT GTT GAA Glu Ile Val Ala Pro Ser Val Val Glu Ser Val Ala Pro Ser Val Glu 180 185 190	574
GAA AGT GTA GCT CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA Glu Ser Val Ala Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu 195 200 205	622
GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA AGT GTT GAA Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Ser Val Glu 210 215 220	670
GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu 225 230 235	718
GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu 240 245 250 255	766
GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA ACT GTT GAA Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu 260 265 270	814
GAA AGT GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATT GTA GCT CCA ACT GTT GAA Glu Ser Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu 275 280 285	862
GAA AGT GTA GCT CCA ACT GTT GAA GAA ATT GTA GTT CCA AGT GTT GAA Glu Ser Val Ala Pro Thr Val Glu Glu Ile Val Val Pro Ser Val Glu 290 295 300	910
GAA AGT GTA GCT CCA AGT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA Glu Ser Val Ala Pro Ser Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu 305 310 315	958
GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu 320 325 330 335	1006
GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA GAA AGT GTA GCT GAA AAT GTT GAA Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Glu 340 345 350	1054

FIGURE 3/B

17/26

GAA ATC GTA GCT CCA AGT GTT GAA GAA ATC GTA GCT CCA ACT GTT GAA Glu Ile Val Ala Pr Ser Val Glu Glu Ile Val Ala Pro Thr Val Glu 355 360 365	1102
GAA AGT GTT GCT GAA AAC GTT GCA ACA AAT TTA TCA GAC AAT CTT TTA Glu Ser Val Ala Glu Asn Val Ala Thr Asn Leu Ser Asp Asn Leu Leu 370 375 380	1150
AGT AAT TTA TTA GGT GGT ATC GAA ACT GAG GAA ATA AAG GAC AGT ATA Ser Asn Leu Leu Gly Gly Ile Glu Thr Glu Glu Ile Lys Asp Ser Ile 385 390 395	1198
TTA AAT GAG ATA GAA GAA GTA AAA GAA AAT GTA GTC ACC ACA ATA CTA Leu Asn Glu Ile Glu Glu Val Lys Glu Asn Val Val Thr Thr Ile Leu 400 405 410 415	1246
GAA AAA GTA GAA GAA ACT ACA GCT GAA AGT GTA ACT ACT TTT AGT AAT Glu Lys Val Glu Glu Thr Thr Ala Glu Ser Val Thr Thr Phe Ser Asn 420 425 430	1294
ATA TTA GAG GAG ATA CAA GAA AAT ACT ATT ACT AAT GAT ACT ATA GAG Ile Leu Glu Glu Ile Gln Glu Asn Thr Ile Thr Asn Asp Thr Ile Glu 435 440 445	1342
GAA AAA TTA GAA GAA CTC CAC GAA AAT GTA TTA AGT GCC GCT TTA GAA Glu Lys Leu Glu Glu Leu His Glu Asn Val Leu Ser Ala Ala Leu Glu 450 455 460	1390
AAT ACC CAA AGT GAA GAG GAA AAG AAA GAA GTA ATA GAT GTA ATT GAA Asn Thr Gln Ser Glu Glu Glu Lys Lys Glu Val Ile Asp Val Ile Glu 465 470 475	1438
GAA GTA AAA GAA GAG GTC GCT ACC ACT TTA ATA GAA ACT GTC GAA CAG Glu Val Lys Glu Glu Val Ala Thr Thr Leu Ile Glu Thr Val Glu Gln 480 485 490 495	1486
GCA GAA GAA GAG AGC GAA AGT ACA ATT ACG GAA ATA TTT GAA AAT TTA Ala Glu Glu Glu Ser Glu Ser Thr Ile Thr Glu Ile Phe Glu Asn Leu 500 505 510	1534
GAA GAA AAT GCA GTA GAA AGT AAT GAA AAA GTT GCA GAG AAT TTA GAG Glu Glu Asn Ala Val Glu Ser Asn Glu Lys Val Ala Glu Asn Leu Glu 515 520 525	1582
AAA TTA AAC GAA ACT GTA TTT AAT ACT GTA TTA GAT AAA GTA GAG GAA Lys Leu Asn Glu Thr Val Phe Asn Thr Val Leu Asp Lys Val Glu Glu 530 535 540	1630
ACA GTA GAA ATT AGC GGA GAA AGT TTA GAA AAC AAT GAA ATG GAT AAA Thr Val Glu Ile Ser Gly Glu Ser Leu Glu Asn Asn Glu Met Asp Lys 545 550 555	1678

FIGURE 3/C

18/26

GCA TTT TTT AGT GAA ATA TTT GAT AAT GTA AAA GGA ATA CAA GAA AAT	1726
Ala Phe Phe Ser Glu Ile Phe Asp Asn Val Lys Gly Ile Gln Glu Asn	
560 565 570 575	
TTA TTA ACA GGT ATG TTT CGA AGT ATA GAA ACC AGT ATA GTA ATC CAA	1774
Leu Leu Thr Gly Met Phe Arg Ser Ile Glu Thr Ser Il Val Ile Gln	
580 585 590	
TCA GAA GAA AAG GTT GAT TTG AAT GAA AAT GTG GTT AGT TCG ATT TTA	1822
Ser Glu Glu Lys Val Asp Leu Asn Glu Asn Val Val Ser Ser Ile Leu	
595 600 605	
GAT AAT ATA GAA AAT ATG AAA GAA GGT TTA TTA AAT AAA TTA GAA AAT	1870
Asp Asn Ile Glu Asn Met Lys Glu Gly Leu Leu Asn Lys Leu Glu Asn	
610 615 620	
ATT TCA AGT ACT GAA GGC GAA	1891
Ile Ser Ser Thr Glu Gly Glu	
625 630	

FIGURE 3/D

19/26

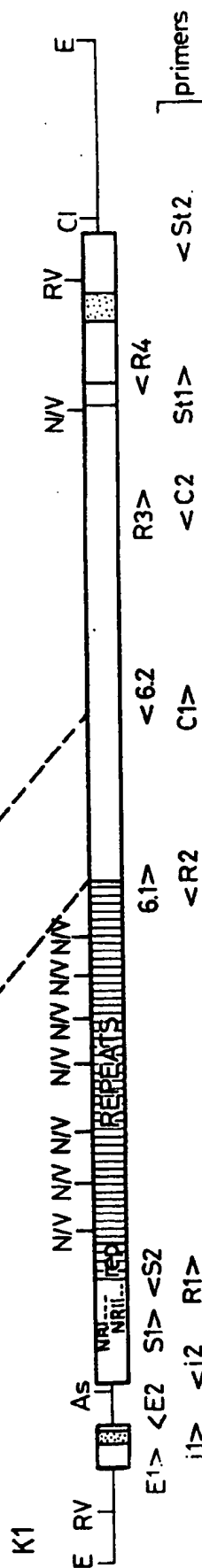
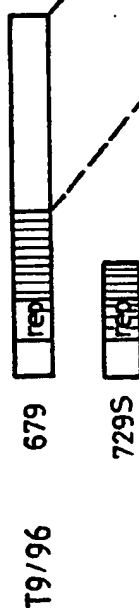
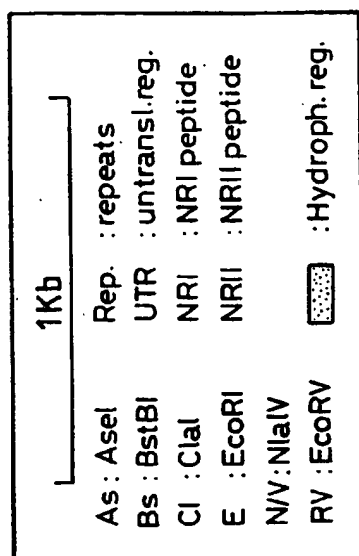


FIG-4a

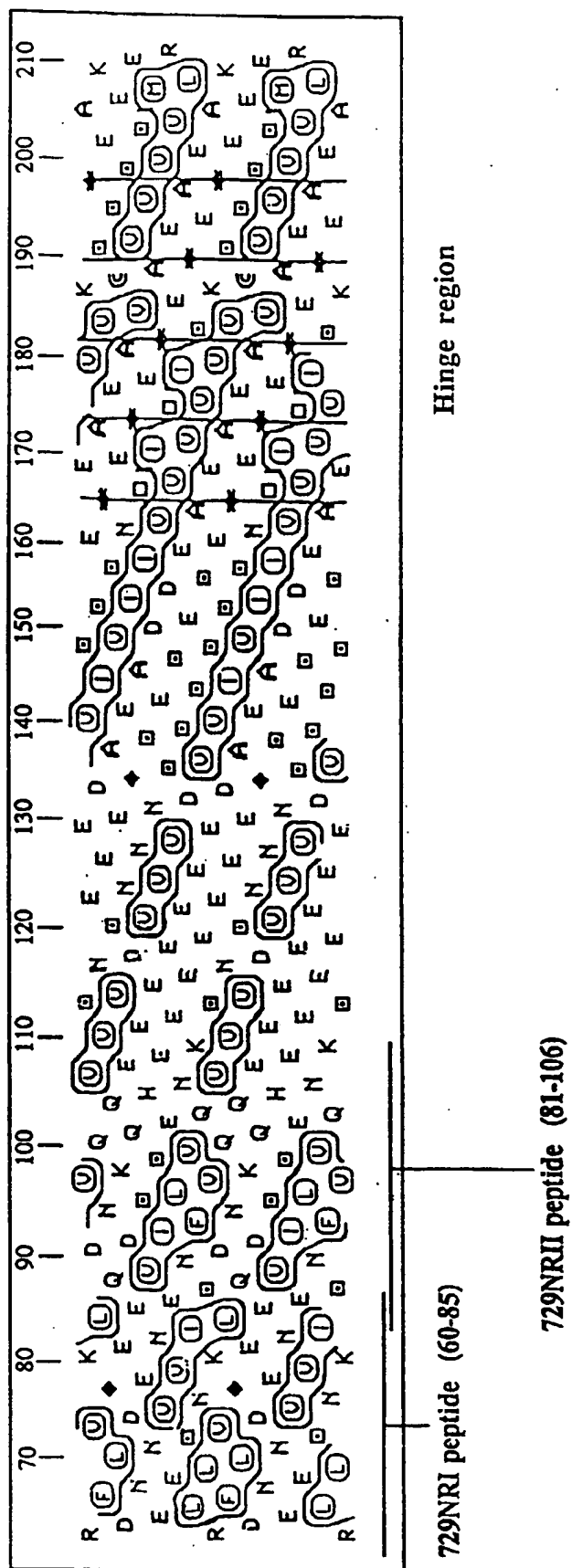
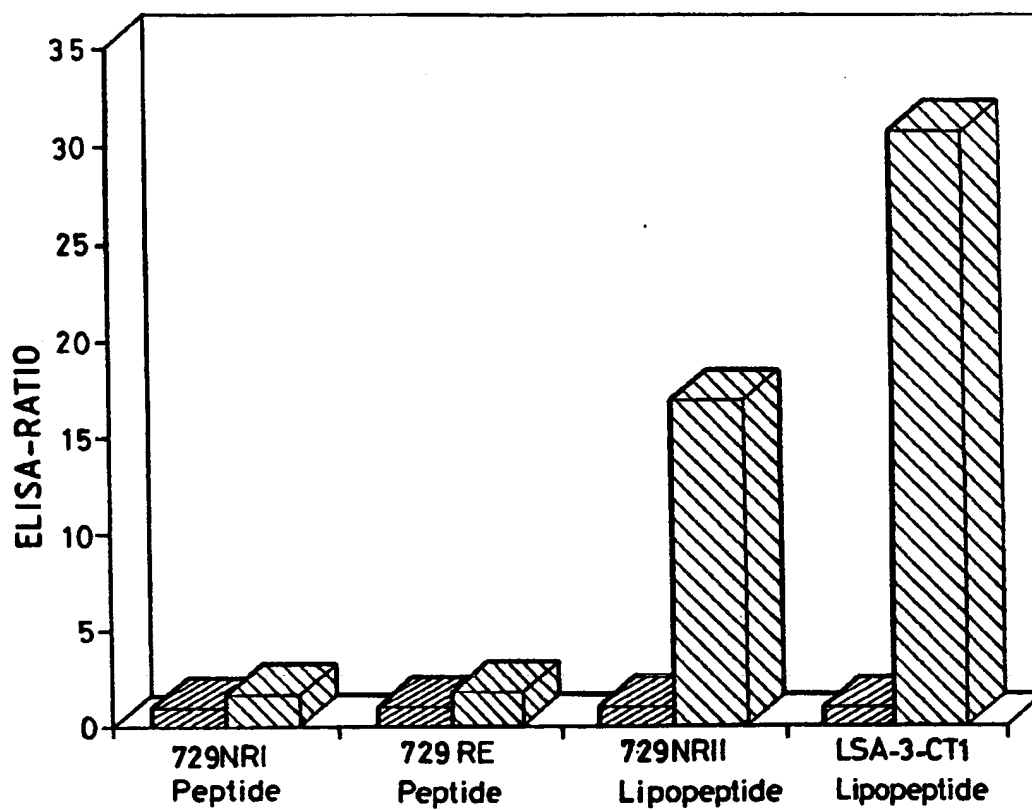
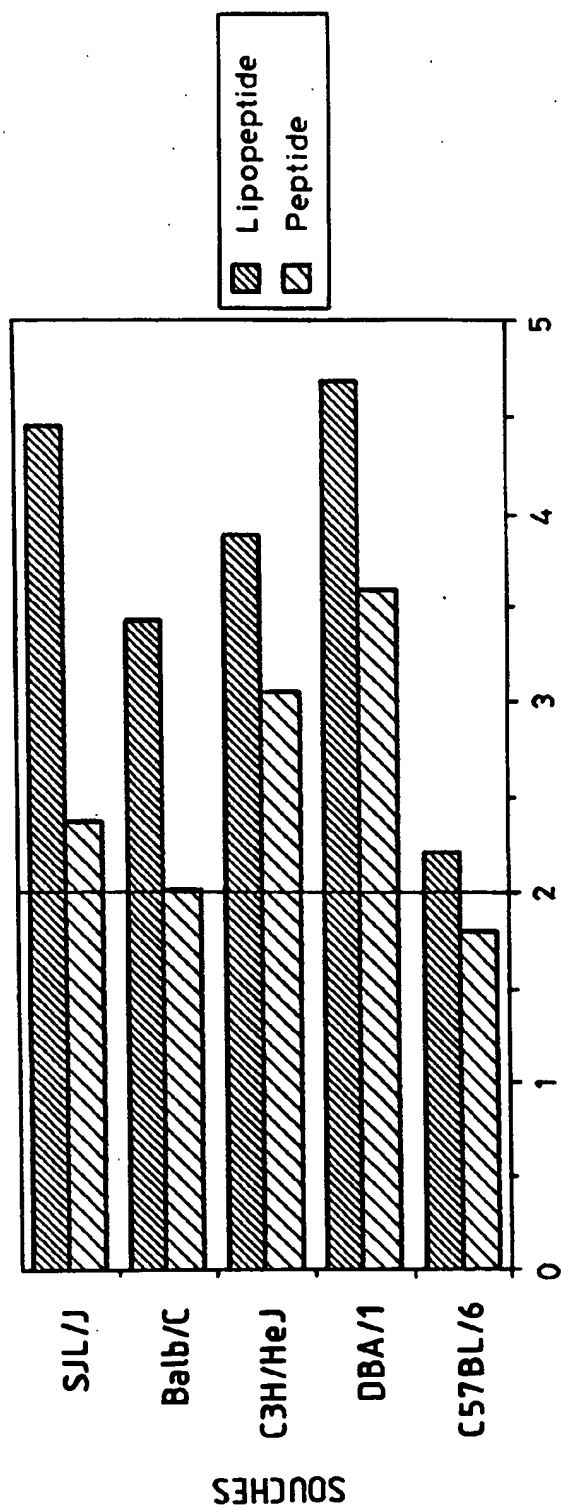


FIG-4b

21/26

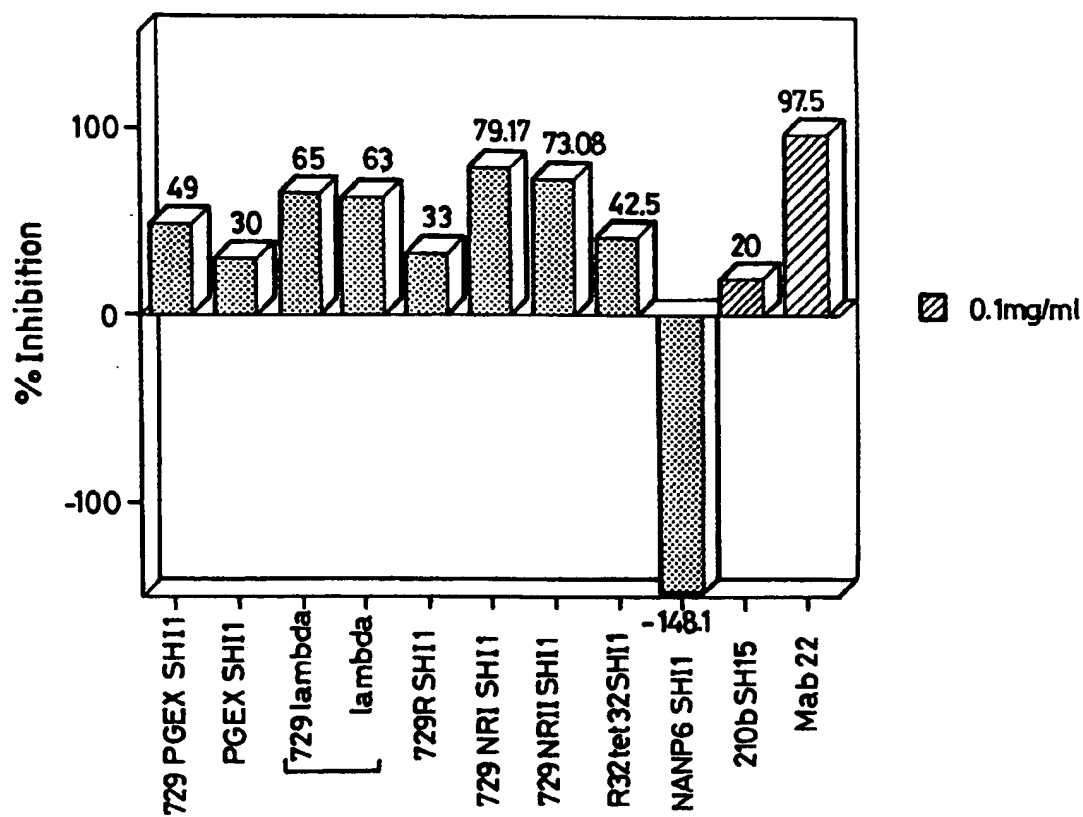
FIG. 5

22/26

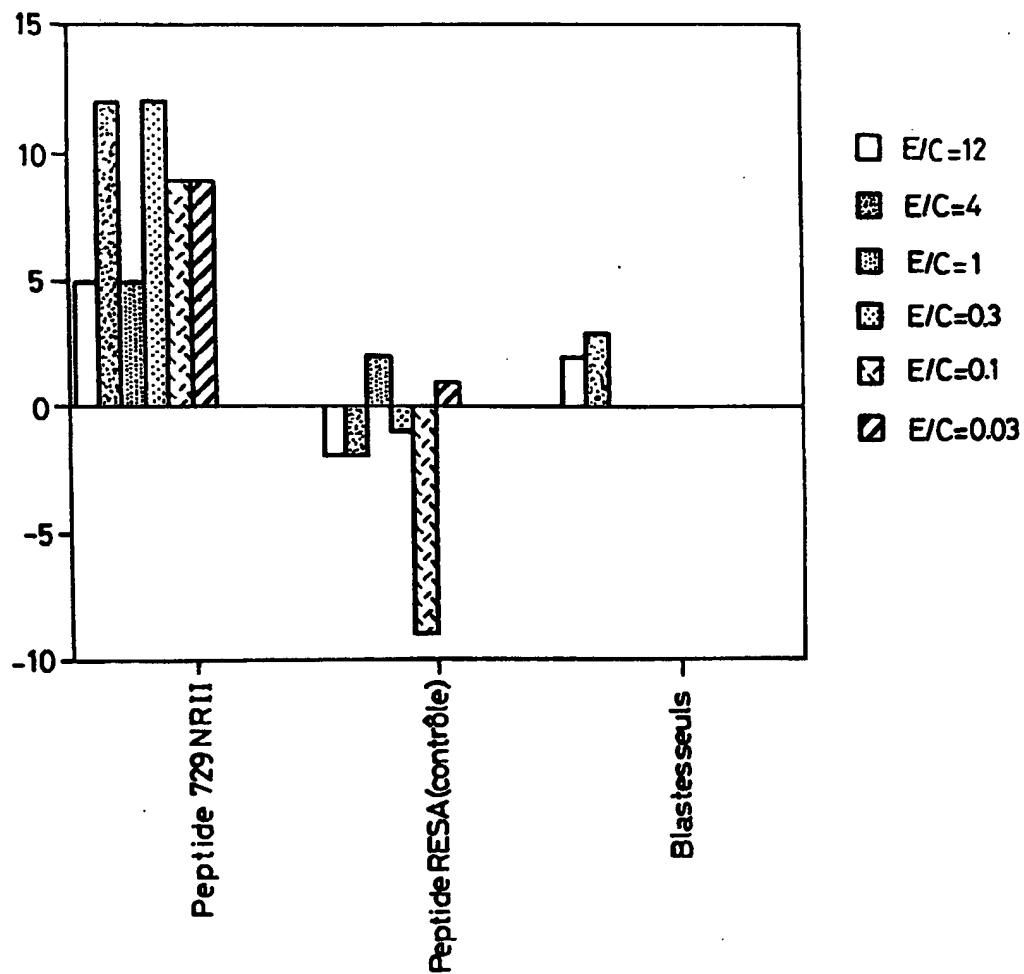


TITRE EN ANTICORPS (LOG)

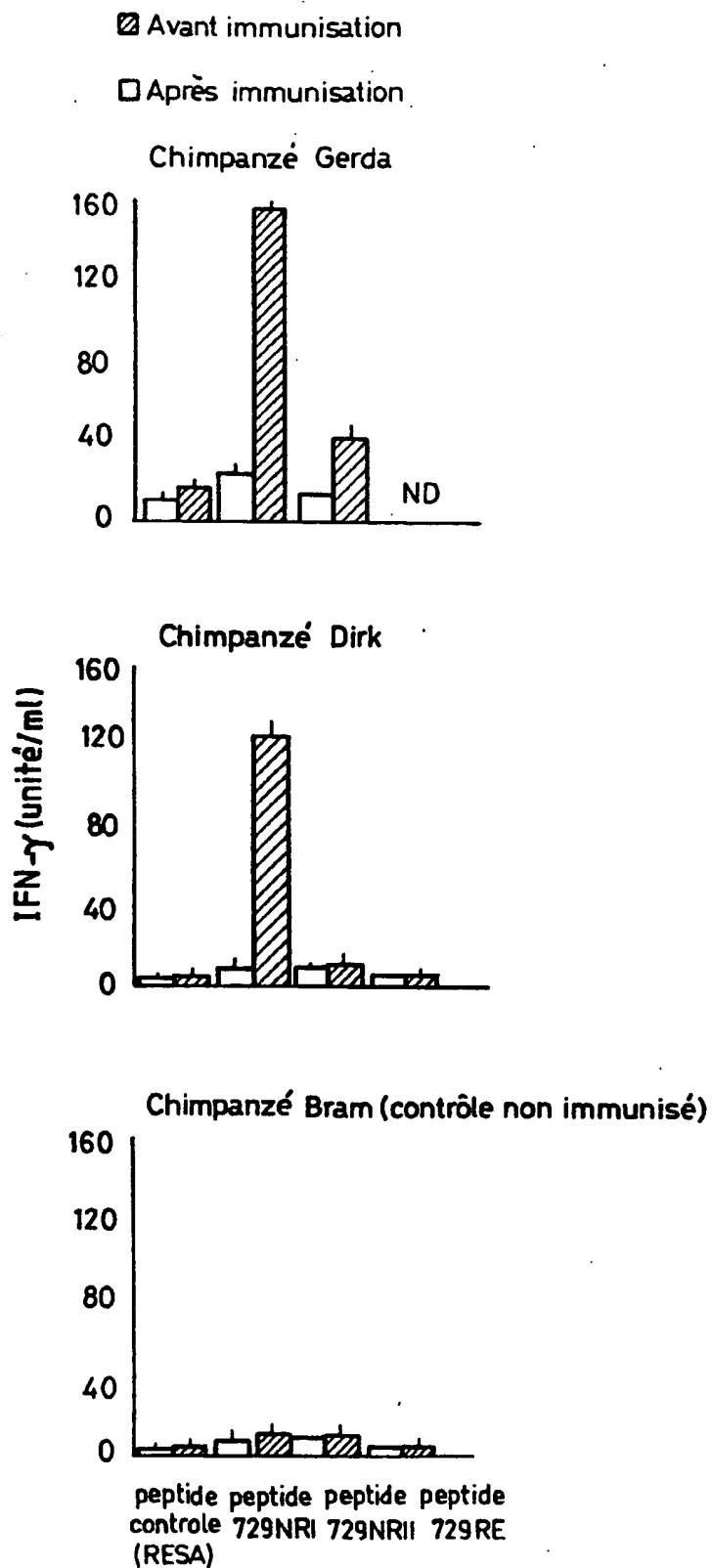
FIG-6

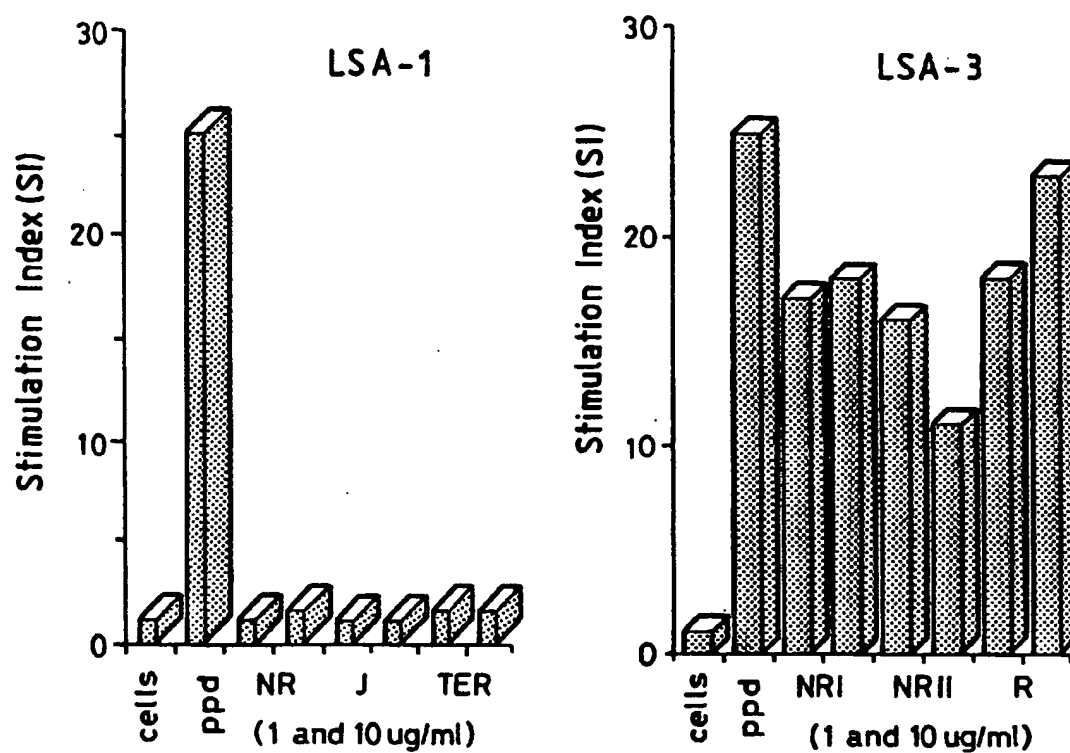
FIG. 7

24/26

**FIG. 8**

25/26

**FIG_9**

FIG_10